

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO-SENSU*

MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *NFKB1*, *TNF- $\alpha$* , E *p38 $\alpha$*  NA  
MUCOSA GÁSTRICA: RELAÇÃO COM CONTAMINAÇÃO POR  
*Helicobacter pylori***

Henrique Sulzbach de Oliveira

Lajeado, janeiro de 2015.

Henrique Sulzbach de Oliveira

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *NFKB1*, *TNF- $\alpha$* , E *p38 $\alpha$*  NA  
MUCOSA GÁSTRICA: RELAÇÃO COM CONTAMINAÇÃO POR  
*Helicobacter pylori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Adriane Pozzobon

Coorientador: Prof. Dr. Vanderlei Biolchi

Lajeado, janeiro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de fazer um agradecimento muito especial à Prof. Dra. Adriane Pozzobon, orientadora desta pesquisa, pela confiança, suporte, competência, pelas oportunidades e, principalmente, pela amizade e humanidade demonstrada durante toda esta etapa de desafios e crescimento. Agradeço também ao coorientador Prof. Dr. Vanderlei Biolchi, sempre prestativo e com o conhecimento necessário para a resolução dos problemas, pela enorme contribuição dada a este trabalho e a meu desenvolvimento intelectual, além do excelente convívio.

A meus pais, Adalberto e Maria Rejane, e à minha irmã, Marcela, pelo apoio incondicional a meus projetos de vida, e por sempre me estimularem a estudar e buscar ser uma pessoa melhor. À minha namorada, Bruna Bohrer Mozzaquattro, pelo carinho, afeto e incentivo em todas as fases do mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Univates, pela oportunidade de desenvolver este projeto em tempo integral, e aos professores integrantes, por todo o conhecimento compartilhado e tão necessário ao desenvolvimento desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Univates, pela amizade e empenho em suprir as necessidades sempre que necessário e, especialmente, às bolsistas de científica Daiane Bizerra Gandor Jantsch e Helouise Richardt Medeiros, pela gentileza e colaboração nos experimentos essenciais a esta pesquisa. Agradeço, também, ao Grupo de Pesquisa coordenado pela Prof. Dra. Márcia Inês Goetttert, pelo convívio e troca de experiências durante todo este período.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à “patota” (Ângela, Bruna e Luciana) por tornarem a jornada mais agradável e divertida.

Ao Dr. Roberto Reckziegel e o Serviço de Endoscopia do Hospital Bruno Born, pelas ideias, disponibilidade e suporte na coleta das amostras essenciais a este estudo. Ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral da UFRGS,

sob a coordenação da Prof. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, pelo acolhimento e oportunidade de desenvolver parte desta pesquisa em suas instalações. E ao Centro de Medicina Diagnóstica, liderado pela Dra. Luciana Knabben de Oliveira Becker Delving, pelas análises histológicas e ensinamentos.

E, finalmente, a todos os voluntários participantes da pesquisa, pela disponibilidade para que este projeto tenha sido realizado. Meu muito obrigado!

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Centro Universitário UNIVATES.

## RESUMO

*Helicobacter pylori* é uma bactéria que infecta aproximadamente 50% da população mundial, podendo causar gastrite crônica e outras formas de dano celular. A relação entre inflamação e câncer é amplamente descrita. Estímulos patogênicos induzem a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que, por sua vez, induz outros mediadores responsáveis pela resposta inflamatória e proliferação celular. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos genes *TNF- $\alpha$* , *NFKB1* e *p38 $\alpha$*  na mucosa gástrica humana e investigar a influência da presença de *H. pylori* na expressão destes em uma população do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram coletadas por endoscopia digestiva alta, sendo o diagnóstico de *H. pylori* realizado através do teste rápido de urease, com posterior confirmação pelo exame anatomopatológico de rotina. O RNA total foi extraído e purificado para posterior síntese de DNAc (DNA complementar) e análise por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real). O algoritmo NormFinder foi utilizado para a análise do gene de referência. Para análise estatística dos genes de interesse foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Das 100 amostras coletadas, 19% foram classificadas como normal, 46% como gastrite crônica não ativa, 27% como gastrite crônica ativa e 8% como metaplasia intestinal. Todas as amostras positivas para *H. pylori* apresentaram inflamação ativa, de acordo com o exame anatomopatológico. Utilizou-se como gene normalizador o *SDHA*, que foi classificado como mais estável em relação ao *ACTB*, *GAPDH*, *B2M* e *HPRT1*. A expressão do *TNF- $\alpha$*  foi significativamente superior nos grupo *H. pylori* Positivo ( $p < 0,0001$ , teste de Mann-Whitney) e Gastrite Crônica Ativa ( $p < 0,01$ , Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn). No entanto, não foi detectada diferença na expressão gênica do *NFKB1* e do *p38 $\alpha$*  entre os grupos. Pode-se concluir que a presença de *H. pylori* pode estar relacionada ao aumento na expressão do *TNF- $\alpha$* , demonstrando a sua influência no processo inflamatório do tecido gástrico. Apesar de não ter sido encontrada alteração na expressão do *NFKB1* e do *p38 $\alpha$*  em nível de RNAm, estudos adicionais devem ser realizados para verificação da influência destes genes nesta via.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*, inflamação, expressão gênica, qPCR, gastrite, gene de referência.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* infects about 50% of the world's population, causing chronic gastritis and other forms of cellular damage. The relationship between inflammation and cancer is well known. Pathogenic stimuli induce the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), which, in turn, induce other mediators responsible for inflammation response and cell proliferation. The present study aimed to evaluate the gene expression of *TNF- $\alpha$* , *NFKB1* and *p38 $\alpha$*  in human gastric mucosa and investigate the *H. pylori* influence in the expression of these genes in a population of Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brazil. The samples were collected by upper endoscopy and the *H. pylori* diagnosis was performed through rapid urease test and histological analysis. The total RNA was extracted and purified for subsequent cDNA synthesis and qPCR analysis. The NormFinder algorithm was used for reference gene analysis. For the statistical analysis of the studied genes were used the Mann-Whitney test and the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's test for multiple comparisons. From the 100 samples collected, 19% were classified as normal, 46% as non-active chronic gastritis, 27% as active chronic gastritis, and 8% as intestinal metaplasia. All samples positive for *H. pylori* demonstrated active inflammation, according to histological analysis. *SDHA* was classified as the most stable gene when compared to *ACTB*, *GAPDH*, *B2M* and *HPRT1*, being chosen to be used as reference gene for qPCR normalization. The *TNF- $\alpha$*  expression was significantly higher in the *H. pylori* ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney's test) and the Active Chronic Gastritis groups ( $p < 0,01$ , Kruskal Wallis test followed by Duncan's multiple comparisons test). However, it wasn't detected any difference in *NFKB1* and *p38 $\alpha$*  expression in the studied groups. It can be concluded that the presence of *H. pylori* can be related to *TNF- $\alpha$*  upregulation, demonstrating its influence in the inflammatory response of the gastric tissue. Although it has not been found changes in the *NFKB1* and *p38 $\alpha$*  expression at mRNA levels, additional studies are needed to verify the influence of these genes in this pathway.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, inflammation, gene expression, qPCR, gastritis, reference gene.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinalização intracelular do fator de necrose tumoral .....	24
Figura 2 - Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B .....	26
Figura 3 - Representação da via p38 MAPK .....	29
Figura 4 - Pequena curvatura do antro gástrico .....	33
Figura 5 - Teste rápido de urease .....	34
Figura 6 - Exame anatomopatológico .....	34
Figura 7 - Gel de agarose representativo da amplificação do <i>B2M</i> .....	36
Figura 8 - Variação intragrupos, conforme análise pelo NormFinder .....	44
Figura 9 - Variação intergrupos, conforme análise pelo NormFinder .....	44
Figura 10 - Representação dos <i>amplicons</i> para cada gene analisado.....	45
Figura 11 - Níveis de expressão (RNAm) de <i>NFKB1</i> em amostras de mucosa gástrica humana, conforme contaminação por <i>H.</i> <i>pylori</i> .....	45
Figura 12 - Níveis de expressão (RNAm) de <i>NFKB1</i> em amostras de mucosa gástrica humana, conforme classificação anatomopatológica .....	46
Figura 13 - Níveis de expressão (RNAm) de <i>p38<math>\alpha</math></i> em amostras de mucosa gástrica humana, conforme contaminação por <i>H.</i> <i>pylori</i> .....	46
Figura 14 - Níveis de expressão (RNAm) de <i>p38<math>\alpha</math></i> em amostras de mucosa gástrica humana, conforme classificação anatomopatológica .....	47
Figura 15 - Níveis de expressão (RNAm) de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> em amostras de mucosa gástrica humana, conforme contaminação por <i>H.</i> <i>pylori</i> .....	47
Figura 16 - Níveis de expressão (RNAm) de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> em amostras de mucosa gástrica humana, conforme classificação anatomopatológica .....	48
Figura 17 - Curva de <i>melting</i> para o gene <i>NFKB1</i> .....	70
Figura 18 - Curva padrão para o gene <i>NFKB1</i> .....	70
Figura 19 - Curva de <i>melting</i> para o gene <i>p38<math>\alpha</math></i> (MAPK14) .....	71
Figura 20 - Curva padrão para o gene <i>p38<math>\alpha</math></i> (MAPK14) .....	71

Figura 21 - Curva de <i>melting</i> para o gene TNF- $\alpha$ .....	72
Figura 22 - Curva padrão para o gene TNF- $\alpha$ .....	72
Figura 23 - Curva de <i>melting</i> para o gene SDHA .....	73
Figura 24 - Curva padrão para o gene SDHA .....	73
Figura 25 - Curva de <i>melting</i> para o gene ACTB .....	74
Figura 26 - Curva padrão para o gene ACTB .....	74
Figura 27 - Curva de <i>melting</i> para o gene B2M .....	75
Figura 28 - Curva padrão para o gene B2M .....	75
Figura 29 - Curva de <i>melting</i> para o gene GAPDH .....	76
Figura 30 - Curva padrão para o gene GAPDH .....	76
Figura 31 - Curva de <i>melting</i> para o gene HPRT1 .....	77
Figura 32 - Curva padrão para o gene HPRT1 .....	77



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos oligonucleotídeos utilizados para seleção do gene de referência .....	37
Tabela 2 - Características dos oligonucleotídeos dos genes de interesse .....	38
Tabela 3 - Quantidade de reagentes padronizada e utilizada para cada reação de qPCR dos genes de interesse .....	39
Tabela 4 - Principais características da população do estudo em relação à contaminação por <i>H. pylori</i> .....	41
Tabela 5 - Principais características da população do estudo em relação à classificação anatomopatológica .....	42
Tabela 6 - Classificação dos genes de referência analisados para normalização das reações de qPCR em amostras de mucosa gástrica, de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelo NormFinder .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTB</b>	Beta actina
<b>ATF-2</b>	<i>Activating transcription factor 2</i>
<b>AP1</b>	<i>Activator protein 1</i>
<b>ASK1</b>	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
<b>B2M</b>	Beta-2-microglobulina
<b>BCL-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BCL-XL</b>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CagA</b>	<i>Citotoxin-associated A</i>
<b>CHOP</b>	<i>C/EBP homologous protein</i>
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>CT</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DNAc</b>	DNA complementar
<b>ELK-1</b>	Membro da família de oncogenes ETS
<b>FADD</b>	<i>FAS-associated via death domain</i>
<b>FLIPL</b>	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
<b>G</b>	Guanina
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase</i>
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>HPRT1</b>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inibidores do NF- $\kappa$ B
<b>IKK</b>	<i>I<math>\kappa</math><math>\beta</math> kinase</i>
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-1R</b>	<i>Interleukin-1 receptor</i>
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>JNK</b>	<i>Jun amino-terminal kinase</i>
<b>L</b>	Litro
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>M</b>	Marcador de peso molecular

<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MDR-1</b>	<i>Multidrug resistance 1</i>
<b>MEKK</b>	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
<b>min</b>	Minuto
<b>MKK</b>	<i>MAPK kinase</i>
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLK</b>	<i>Mixed lineage kinase</i>
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mPGES<sub>1</sub></b>	<i>Microsomal PGE-sintase 1</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor kappa beta</i>
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>OipA</b>	<i>Outer inflammatory protein A</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative PCR</i>
<b>RelA</b>	<i>Rethiculoendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
<b>RelB</b>	<i>Rethiculoendotheliosis viral oncogene homolog B</i>
<b>RIP</b>	<i>Receptor (TNFRSF)-interacting protein</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>s</b>	Segundo
<b>SDHA</b>	<i>Succinate dehydrogenase complex Subunit A, flavoprotein (Fp)</i>
<b>Stat1</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TNFR</b>	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
<b>TNF-α</b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TRADD</b>	<i>TNFR-associated via death domain</i>
<b>TRAF2</b>	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
<b>VacA</b>	<i>Vacuolating citotoxin A</i>
<b>xg</b>	Força centrífuga
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>μg</b>	Micrograma

**$\mu\text{L}$**

Microlitro

**$\mu\text{Mol}$**

Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>17</b>
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
4.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....	19
4.1.1 Diagnóstico e Tratamento .....	20
4.2 <i>H. pylori</i> , Inflamação e Lesão Tecidual Gástrica .....	21
4.3 <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	23
4.4 <i>NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	25
4.5 <i>p38</i> .....	27
4.6 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real .....	29
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
5.1 Delineamento do Estudo .....	31
5.2 Amostra de Estudo .....	31
5.3 Ambiente de Pesquisa .....	31
5.4 Aspectos Éticos .....	32
5.5 Coleta das Amostras .....	32
5.6 Diagnóstico de Infecção por <i>H. pylori</i> e Análise Histológica .....	33
5.7 Análise da Expressão Gênica .....	34
5.7.1 Extração do RNA .....	34
5.7.2 Quantificação do RNA .....	35
5.7.3 Síntese do DNA Complementar (DNAC) .....	35
5.7.4 PCR Quantitativa em Tempo Real .....	36
5.7.4.1 Protocolo para Análise dos Genes de Referência .....	37
5.7.4.2 Análise dos Genes de Interesse .....	38
5.8 Análise de Dados .....	39
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
6.1 Classificação Quanto à Infecção por <i>H. pylori</i> .....	41
6.2 Classificação Quanto à Análise Anatomopatológica .....	42
6.3 Análise do Gene de Referência .....	43
6.4 Análise da Expressão de <i>NFKB1</i> , <i>p38<math>\alpha</math></i> , e <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	44

<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A patogênese da gastrite, úlcera gástrica, duodenite e úlcera duodenal era antigamente atribuída ao desequilíbrio entre mecanismos de defesa do hospedeiro e secreção ácida. Contudo, no início dos anos 80, Marshall e Warren isolaram, pela primeira vez, a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) na mucosa gástrica, fato que levantou inúmeros questionamentos relacionados à gastroenterologia. A infecção por esta bactéria é considerada a principal causa de gastrite crônica ativa e desempenha importante papel na ulcera péptica (MARSHALL, 1994).

A relação entre a inflamação e o câncer é amplamente descrita. Virchow, em 1863, postulou que a origem do câncer se dava em locais com inflamação crônica, baseando-se em algumas classes de agentes irritantes que causavam injúria tecidual provocando inflamação e, conseqüentemente, aumentando a proliferação celular. Embora atualmente seja claro que a proliferação celular sozinha não é capaz de provocar o câncer, a manutenção da proliferação em um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativo e agentes indutores de dano ao DNA potencializam o risco de desenvolvimento de neoplasia (BALKWILL, MANTOVANI, 2001).

Desde a descoberta do *H. pylori* houve uma mudança na teoria do desenvolvimento do câncer gástrico, associando fortemente a sua infecção com o aparecimento desta doença (SUZUKI et al., 2007). A estimativa para os Estados Unidos é de 22.220 novos casos de câncer gástrico em 2014, com prevalência no sexo masculino (SIEGEL et al., 2014). Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2014), esperam-se 12.870 casos novos de câncer de estômago em

homens e 7.520 em mulheres para o Brasil. Isto corresponde a um risco estimado de 13,19 novos casos novos a cada 100 mil homens e 7,41 a cada 100 mil mulheres.

A infecção pelo *H. pylori* induz uma inflamação na mucosa gástrica, promovendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (MISIEWICZ, 1995). O fator de transcrição *nuclear factor kappa-beta* (NF- $\kappa$ B) regula a expressão de diversas substâncias relacionadas à inflamação tais como TNF, interleucinas, dentre outras (AGGARWAL, 2004). O comportamento celular em resposta a estímulos extracelulares é mediado pela via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). O p38 é membro da superfamília das MAPK, estando envolvido com apoptose (LENASSI; PLEMENITAŠ, 2006). Diversos estudos relacionam a expressão do p38 com outras citocinas, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e o câncer, contudo apresentam resultados divergentes (ZECHNER et al., 1998; IVANOV; RONAI, 2000; DEZUTTER; DAVIS, 2001; SAURIN et al., 2000; VALLADARES et al., 2000).

Considerando o alto índice de prevalência da contaminação por *H. pylori*, a relação desta bactéria com a inflamação crônica e, conseqüentemente, com o câncer gástrico, torna-se importante conhecer os mecanismos responsáveis pela resposta inflamatória do hospedeiro, incluindo a ativação de genes relacionados a vias específicas. O conhecimento das vias inflamatórias relacionadas ao processo patogênico pode contribuir na busca de melhores tratamentos para esta doença que traz prejuízos socioeconômicos e em saúde pública a nível mundial.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão dos genes *NFKB1*, *TNF- $\alpha$* , e *p38 $\alpha$*  em amostras de mucosa gástrica, obtidas através de endoscopia digestiva alta em uma população do Vale do Taquari (Rio Grande do Sul, Brasil), e verificar a sua relação com o resultado obtido pelo exame anatomopatológico e à contaminação por *H. pylori*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a expressão de *NFKB1*, *TNF- $\alpha$* , e *p38 $\alpha$*  em amostras da mucosa gástrica;
- Verificar a influência da contaminação por *H. pylori* na expressão dos genes avaliados para as amostras coletadas;
- Relacionar a expressão dos genes estudados com o tipo de lesão encontrada pelo exame anatomopatológico;
- Determinar o melhor gene de referência para ser utilizado como normalizador para as reações de qPCR.

### 3 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Gastroenterologia considera a infecção por *H. pylori* nos países em desenvolvimento uma questão de saúde pública, requerendo o desenvolvimento de intervenções sanitárias com a finalidade de reduzir a prevalência e incidências mundiais. Dados publicados pela Organização, sobre a incidência no Brasil, demonstraram 30% de prevalência em crianças de 6 a 8 anos, 78% para a faixa etária de 10 a 19 anos, e 82% de prevalência em adultos (HUNT et al., 2010).

Segundo estatísticas globais, estima-se que no ano de 2008 houve um total de 989.600 novos casos de câncer de estômago e 738.000 mortes relacionadas à doença. Mais de 70% dos novos casos e mortes ocorreram em países em desenvolvimento, e as taxas de câncer gástrico foram cerca de duas vezes maiores em homens do que em mulheres (JEMAL et al., 2011). Variações regionais na incidência da doença refletem, em parte, padrões dietéticos diferentes e a prevalência da infecção pelo *H. pylori* (PARKIN, 2006).

Muller e colaboradores (2007) demonstraram prevalência de 76% de contaminação por *H. pylori*, com consequente diagnóstico de gastrite crônica, em amostra de 2.019 pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta na cidade de Santa Maria – RS. Pacientes infectados tiveram uma razão de chances 10 vezes maior de apresentar qualquer grau de lesão da mucosa gástrica. Segundo o INCA (2014), sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico em homens é o quarto mais comum nas regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil, e o segundo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste. Para as mulheres, é o sexto mais frequente nas regiões Sul e Centro-Oeste, o terceiro na região Norte, e o quinto mais comum nas regiões Sudeste e Nordeste.

Atualmente a relação entre inflamação, imunidade inata e câncer é amplamente aceita, entretanto os mecanismos celulares e moleculares que mediam estes processos permanecem desconhecidos. Portanto, é importante a compreensão da patogênese da gastrite e do adenocarcinoma induzido pelo *H.pylori*, não unicamente para desenvolver tratamentos mais efetivos, mas também porque pode servir como paradigma para o papel da inflamação crônica na gênese de outras malignidades do trato gastrointestinal (PEEK JR; CRABTREE, 2006).

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 *Helicobacter pylori*

O *H. pylori* é uma bactéria gram-negativa que adere à superfície da mucosa gástrica, causando inflamação evidente sem invasão de células epiteliais gástricas (CLYNE; DRUMM, 1993). As vias oral-oral e fecal-oral parecem ser as principais formas de transmissão, sendo que cerca de 50% da população mundial está contaminada pelo *H. pylori* e os principais fatores de risco são: idade, sexo, etnia, fatores ambientais e contextuais ligados ao nível socioeconômico (HUNT et al., 2010).

A pesquisa com *H. pylori* mudou paradigmas relacionados à causa da doença gástrica. Médicos atribuíam o surgimento de úlceras ao estresse ou ansiedade e não acreditavam que uma bactéria pudesse causar câncer, sendo o *H. pylori* a primeira espécie de bactéria a ser reconhecida pela *International Agency for Research on Cancer* como um carcinógeno do grupo I, mesma categoria a qual pertencem o fumo, a radiação, e o asbesto (TESTERMAN; MORRIS, 2014).

Fatores de virulência do microrganismo, a resposta inflamatória da mucosa e a alteração da secreção ácida gástrica estão entre os principais mecanismos patogênicos relacionados à bactéria (SIQUEIRA et al., 2007). A urease é um dos fatores de virulência essenciais para a colonização da mucosa gástrica, pois degrada a ureia em amônia e dióxido de carbono, criando uma nuvem que protege a bactéria da acidez estomacal (PERRAIS et al., 2013). Mesmo com a alta prevalência desta infecção, a maioria dos infectados não desenvolvem complicações e nem apresentam sintomas clínicos, sugerindo a existência de estirpes menos virulentas

(SAMPAIO; SANTOS, 2008). Diferenças geográficas na incidência de câncer gástrico podem ser explicadas, ao menos em parte, pela presença de diferentes tipos de fatores de virulência do *H. pylori*, especialmente CagA (*citotoxin-associated gene A*), VacA (*vacuolating cytotoxin A*) e OipA (*outer inflammatory protein A*) (van DOORN et al., 1998; YAMAOKA et al., 1999; YAMAOKA et al., 2002; YAMAOKA, 2010).

No Brasil, estudos populacionais indicam que as taxas de prevalência da infecção por *H. pylori* ainda são muito elevadas tanto em regiões rurais quanto urbanas, crianças ou adultos (PARENTE; PARENTE, 2010). Foi verificada alta prevalência de infecção em crianças de comunidades indígenas da região centro-oeste do país (ESCOBAR-PARDO et al., 2011). Na população adulta de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil) observou-se uma taxa de prevalência de infecção de 63,4%, a qual foi associada com o aumento da idade, baixo nível socioeconômico e educacional (SANTOS et al., 2005).

#### **4.1.1 Diagnóstico e Tratamento**

A endoscopia digestiva alta é, segundo a Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (SOBED, 2013), “um exame indicado para avaliação diagnóstica e, quando possível, tratamento das doenças da parte superior do tubo digestivo, incluindo o esôfago, o estômago e a porção inicial do duodeno”, sendo considerado um exame seguro, com complicações mais sérias sendo muito raras, ocorrendo em menos de 0,2% dos casos.

Quando indicada, a endoscopia digestiva alta deve ser acompanhada da coleta de fragmentos para estudo (biópsias), sendo recomendada, ao menos, uma amostra do corpo e outra do antro para a realização da análise histológica e teste de urease para melhor identificação do *H. pylori*. Quando possível, drogas anti secretoras e antimicrobianas devem ser suspensas duas e quatro semanas antes, respectivamente (COELHO et al., 2013).

O tratamento é feito à base de antibióticos. Contudo, a resistência do *H. pylori* a antibióticos comumente utilizados está aumentando no mundo todo. No geral, a

resistência ao metronidazol é prevalente, enquanto a resistência à amoxicilina e tetraciclina é baixa, porém pode haver variação dependendo do continente (TESTERMAN; MORRIS, 2014).

#### **4.2 *H. pylori*, Inflamação e Lesão Tecidual Gástrica**

Na maioria dos indivíduos infectados pelo *H. pylori* a inflamação é confinada à mucosa do antro gástrico. No entanto, em alguns indivíduos, a inflamação pode comprometer o corpo gástrico levando à pangastrite (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003). Mecanismos sugeridos para a carcinogênese na infecção por *H. pylori* incluem: presença de radicais mutagênicos produzidos pela resposta inflamatória à infecção, redução nos antioxidantes da mucosa, e indução de um estado hiperproliferativo (CORREA, 1995; PRESTON-MARTIN et al., 1990).

Indivíduos infectados pelo *H. pylori* e com histórico de câncer gástrico na família podem apresentar risco até 16 vezes maior de desenvolvimento de câncer gástrico do que indivíduos não infectados e sem histórico (SEPÚLVEDA, 2001). No entanto, apenas uma pequena porcentagem de pessoas contaminadas desenvolverá neoplasia (aproximadamente 1% a 3%) (AGAARWAL et al., 2006), sendo o aumento do risco relacionado a interações específicas entre o patógeno e o hospedeiro que, por sua vez, são dependentes de fatores bacteriológicos específicos e/ou respostas inflamatórias reguladas pelos genes do hospedeiro (PEEK JR; CRABTREE, 2006).

Em resposta à injúria tecidual, uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém a resposta do hospedeiro frente à agressão. Isto envolve a ativação e migração direcionada de leucócitos e a ativação dos macrófagos teciduais. Citocinas quimiostáticas possuem alto grau de especificidade e atração para populações específicas de leucócitos recrutando as células e ditando a evolução natural da resposta inflamatória (HOMEY; MULLER; ZLOTNIK, 2002).

A gastrite induzida pelo *H. pylori* pode levar também a outras formas de dano e lesão celular (HAHM et al., 2003). A forma mais prevalente de neoplasia gástrica, o adenocarcinoma tipo-intestinal, evolui através de uma série de eventos

histológicos que são iniciados pela transição da mucosa normal para gastrite crônica superficial, que então leva à gastrite atrófica, metaplasia intestinal e, finalmente, para displasia e neoplasia (CORREA, 1992). Gastrite crônica atrófica é o resultado de uma inflamação crônica ativa que pode, por fim, levar à destruição de glândulas gástricas e a perda da arquitetura normal da mucosa. Metaplasia intestinal consiste na substituição da mucosa gástrica por um epitélio que histologicamente lembra a mucosa intestinal. Displasia é considerada como um passo inicial em direção à transformação em neoplasia (CORREA et al., 1975; PELETEIRO, 2006).

Muller e colaboradores (2007) demonstraram que pacientes com infecção pelo *H. pylori* apresentavam risco 10 vezes maior de apresentar algum grau de lesão da mucosa gástrica do que aqueles com ausência de infecção. Setenta e sete por cento apresentou gastrite crônica não atrófica, sendo 82% dos pacientes infectados, 3% apresentou gastrite atrófica, com a infecção presente em 71% dos casos e finalmente 15% apresentou metaplasia intestinal com infecção presente em 66% dos pacientes.

A infecção pelo *H. pylori* induz um infiltrado inflamatório na mucosa gástrica de neutrófilos, monócitos, linfócitos e plasmócitos e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (1, 2, 6 e 8), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (MISIEWICZ, 1995). A expressão de genes na mucosa gástrica foi relacionada à infecção por *H. pylori* e a alterações na mucosa gástrica. (ZUK et al., 2012; MITSUNO et al., 2001; MEYER-TER-VENH et al., 2000; NAUMANN et al., 1999).

Diversos estudos vêm sendo realizados no intuito de conhecer os mecanismos e a relação do *H. pylori* e as lesões teciduais gástricas. Nardone e colaboradores (2004) demonstraram que a indução por *H. pylori* da COX-2 (ciclooxigenase 2) e mPGES<sub>1</sub> (*microsomal PGE-sintase 1*) está associado com o aumento da produção de MDR-1 (*multidrug resistance 1*) e a proteína anti-apoptótica BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*), que podem contribuir para a tumorigênese gástrica e a resistência à terapia. Já Pimentel-Nunes e colaboradores (2012) sugeriram que a via de sinalização dos receptores tipo *Toll* pode ter papel importante na carcinogênese gástrica e pode ser o elo entre o *H. pylori* e câncer.

Salih e colaboradores (2013) demonstraram aumento da proteína p53 no tecido tumoral gástrico, tendo sua expressão no tecido com gastrite sendo significativamente associada ao *H. pylori*. Já Perrais e colaboradores (2013) demonstraram aumento na expressão de genes produtores de mucinas, havendo influência da urease, um dos fatores de virulência da *H. pylori*.

Biomarcadores inflamatórios tais como TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, e interleucinas, podem ser utilizados para monitorar o progresso de doenças, bem como serem explorados para o desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias para prevenir e tratar o câncer (AGGARWAL et al., 2006).

#### **4.3 TNF- $\alpha$**

O fator de necrose tumoral alfa é uma proteína transmembrana tipo 2 com uma terminação amino intracelular. Possui potencial de sinalização tanto como uma proteína integrada à membrana, ou como uma citocina solúvel liberada após clivagem proteolítica. Sua forma solúvel é uma proteína de 17 kDa. Existem dois receptores para o TNF: TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), encontrado na maioria das células do corpo, e o TNFR2 (*tumor necrosis factor receptor 2*), expresso principalmente em células hematopoiéticas. (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; HELGANS; PFEFFER, 2005). O gene *TNF- $\alpha$*  está localizado na banda 21, sub-banda 3, do braço curto do cromossomo 6 e possui 4 éxons (Fonte: NCBI. Acessado em 17/11/2014. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124)).

O TNF- $\alpha$  foi isolado primeiramente como uma citocina anticâncer, exercendo papel terapêutico quando expresso localmente pelas células do sistema imune. No entanto, quando desregulado e secretado na circulação, pode mediar uma série de doenças, inclusive câncer (AGGARWAL, 2003). Estímulos patogênicos induzem a expressão de *TNF- $\alpha$*  que, por sua vez, induz outros mediadores e proteases responsáveis pela resposta inflamatória. É produzido também por tumores, podendo agir como um promotor tumoral endógeno (BALKWILL, 2002).



Segundo Balkwill (2009), a ativação do receptor TNFR1 pode levar a dois resultados finais diferentes dependendo do contexto celular. A via padrão é a indução de genes envolvidos na inflamação e sobrevivência celular. Ao ligar-se ao TNFR1, o TNF induz uma série de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento através da ativação de fatores de transcrição AP1 (*activator protein 1*) ou I $\kappa$ B quinases (IKKs) que, em resposta, ativam o NF- $\kappa$ B. A ativação do NF- $\kappa$ B também induz importantes reguladores negativos de apoptose tais como FLIPL (*FLICE-like inhibitory protein*), BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) e superóxido dismutase. Se a ativação de NF- $\kappa$ B é inadequada, a apoptose é mediada pela caspase 8 e, através do acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio, pela ativação sustentada de JNK (*Jun amino-terminal kinase*) e vias mitocondriais. A figura 1 demonstra a via de sinalização desencadeada pela ativação dos receptores TNFR e sua relação com o NF- $\kappa$ B e as MAPKs (incluindo o p38).

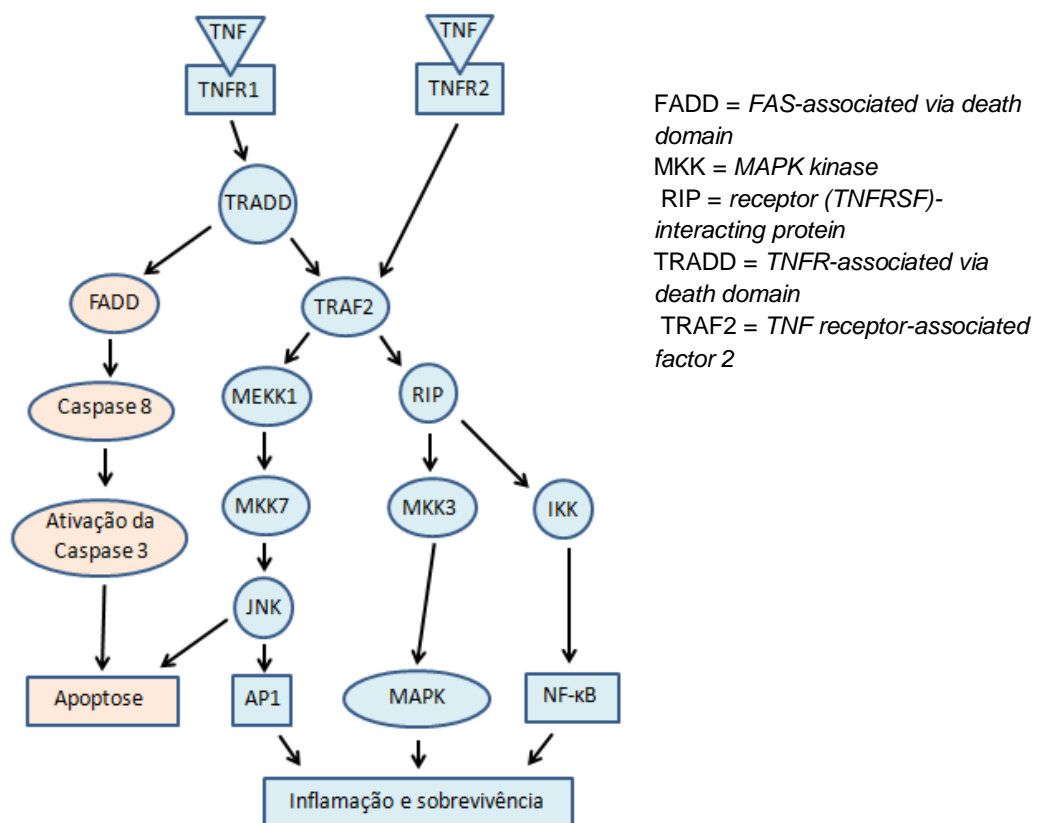


Figura 1 - Sinalização intracelular do fator de necrose tumoral.

Fonte: adaptado, pelo autor, de Balkwill (2009).

O TNF- $\alpha$  tem sido associado a todos os passos envolvidos na gênese tumoral, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação,

invasão, angiogênese e metástase (AGGARWAL, 2006). Segundo Pimentel-Nunes e colaboradores (2012), a contaminação por *H. pylori* aumenta significativamente a expressão de *TNF- $\alpha$*  tanto na mucosa normal quanto na metaplasia intestinal, enquanto na displasia/câncer sua expressão encontra-se aumentada, independentemente da contaminação ou não.

#### 4.4 NF- $\kappa$ B

O NF- $\kappa$ B possui um papel essencial na inflamação e imunidade inata, além de ser cada vez mais reconhecido pelo seu papel crucial em vários passos da iniciação e progressão do câncer, cooperando com outras vias de sinalização celular (HOESEL; SCHMID, 2013). Este fator de transcrição regula a expressão de diversas substâncias relacionadas à inflamação tais como TNF, interleucinas, quimiocinas, COX-2, dentre outras. Este fator encontra-se inativado na maioria das células, porém células cancerosas o apresentam na forma ativada. Esta ativação é induzida por uma ampla variedade de estímulos inflamatórios e carcinógenos (AGGARWAL, 2004; SHISHODIA; AGGARWAL, 2004). O gene *NFKB1* está localizado na banda 24 do braço longo do cromossomo 4 e possui 25 éxons (fonte: NCBI. Acessado em 17/11/2014. Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4790](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4790)).

No total, cinco membros desta família foram identificados, denominados como RelA (*v-rel rethiculoendotheliosis viral oncogene homolog A*), RelB (*v-rel rethiculoendotheliosis viral oncogene homolog B*), c-Rel, NF- $\kappa$ B1 e NF- $\kappa$ B2. Ao contrário dos outros integrantes desta família, o NF- $\kappa$ B1 e NF- $\kappa$ B2 são sintetizados como pró-formas (p105 e p100) e proteoliticamente processados a p50 e p52, respectivamente (CAAMAÑO; HUNTER, 2002). Todos os membros desta família de proteínas formam dímeros e compartilham algumas características, como um domínio homólogo Rel essencial para a dimerização, bem como para ligação ao DNA (MAY; GHOSH, 1997). Na maioria das células quiescentes estes dímeros estão ligados a moléculas da família de proteínas I $\kappa$ B (inibidores do NF- $\kappa$ B). Estes inibidores associam-se com os domínios dos fatores de transcrição que se ligam ao DNA, tornando-os inativos transcritionalmente (MARIENFELD, 2003). Para atuarem como ativadores transcripcionais, p50 (NF- $\kappa$ B1) e p52 (NF- $\kappa$ B2) devem estar ligados a

um membro da família que possua um domínio de transativação, tais como RelA ou RelB (HOESEL; SCHMID, 2013).

Na via clássica de sinalização do NF- $\kappa$ B (Figura 2), lipossacarídeos (LPS), TNF- $\alpha$  ou interleucina-1 (IL-1) ativam receptores do tipo *Toll* (TLRs), do fator de necrose tumoral (TNFR) e da interleucina-1 (IL-1R), respectivamente. Diversos sinais levam à ativação de IKK $\beta$  no complexo IKK, que pode então fosforilar I $\kappa$ B. Esta fosforilação é um pré-requisito para a subsequente poliubiquitinação, que resultará na degradação proteossômica de I $\kappa$ B possibilitando, então, que o dímero de NF- $\kappa$ B (p50/RelA) possa translocar até o núcleo e ativar a expressão de genes alvo (HOESEL; SCHMID, 2013).

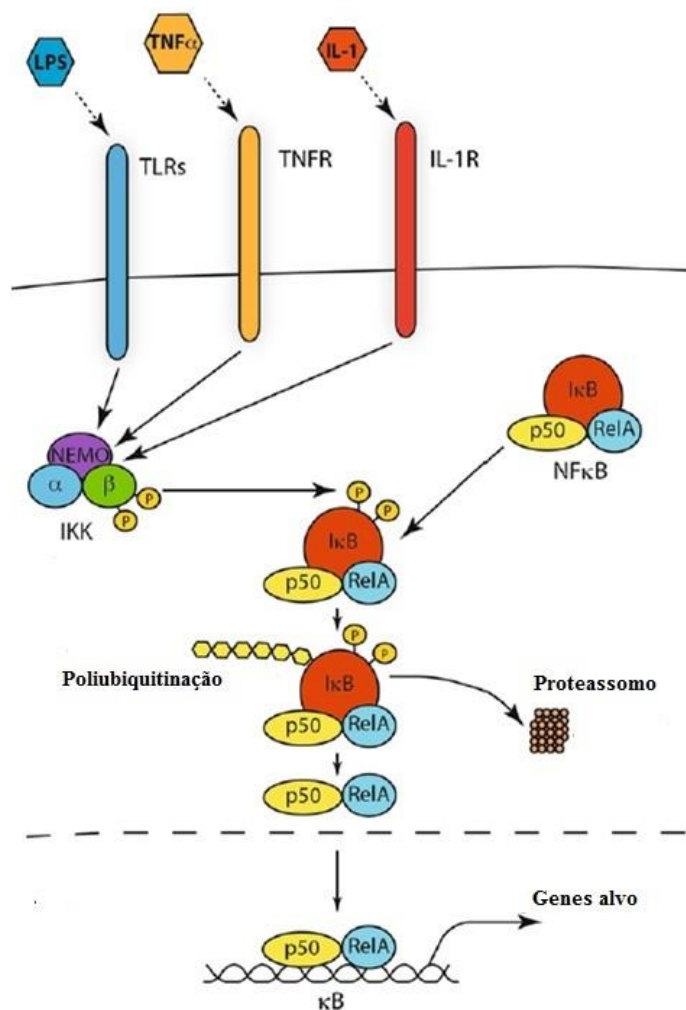


Figura 2 - Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B.

Fonte: Adaptado, pelo autor, de HOESEL & SCHMID (2013).

A translocação nuclear de NF- $\kappa$ B é seguida do aumento da expressão de IL-8 (interleucina-8) (NAITO; YOSHIKAWA, 2002). *In vitro*, o *H. pylori* estimula a liberação de IL-8, e estes eventos requerem interação entre a bactéria e as células epiteliais da mucosa gástrica, que, através deste mecanismo, estimulam a quimiotaxia de neutrófilos (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003). Segundo revisão de Aggarwal e colaboradores (2006), o NF- $\kappa$ B serve de mediador da gênese tumoral, aumenta a resistência a agentes quimioterápicos e radiações  $\gamma$ , e atua como fator de crescimento em células tumorais. Porém, Pimentel-Nunes e colaboradores (2012) não encontraram diferenças significativas na expressão de NF- $\kappa$ B na mucosa gástrica de humanos em diferentes tipos de lesão, com contaminação ou não pelo *H.pylori*, em comparação com a mucosa gástrica normal.

#### 4.5 p38

O p38 é uma proteína-quinase ativada por mitógenos envolvida na regulação da biossíntese de citocinas inflamatórias (LEE et al, 1994). Está relacionada a respostas ao estresse, tais como estresse osmótico, choque térmico ou infecção (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001; CUENDA; ROUSSEAU, 2007). Proteínas quinases são os principais componentes de vias controladoras da embriogênese, diferenciação celular, proliferação, e morte celular (PEARSON et al, 2001).

A família p38 MAPK consiste em quatro isoformas identificadas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , e p38 $\delta$ , codificadas pelos genes MAPK14, MAPK11, MAPK12, e MAPK13, respectivamente. A maior parte das publicações sobre p38 MAPKs referem-se ao p38 $\alpha$  (LEE et al, 1994; WAGNER; NEBRED, 2009). As quatro isoformas são largamente expressas, no entanto a expressão de p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , e p38 $\delta$  aparentam ser tecido-específicas: por exemplo, p38 $\beta$  é abundante no cérebro, p38 $\gamma$  no músculo esquelético, e p38 $\delta$  em glândulas endócrinas (CUENDA; ROUSSEAU, 2007; CUADRADO; NEBRED, 2010). Além disso, a família p38 MAPK pode ser também dividida em dois subconjuntos baseados nas homologias entre suas sequências, especificidade de substratos, e sensibilidade a inibidores químicos, com p38 $\alpha$  e p38 $\beta$  em um grupo, e p38 $\gamma$  e p38 $\delta$  em outro (RISCO; CUENDA, 2012). O gene *p38 $\alpha$*  (MAPK14) está localizado na banda 21, sub-banda 3, do braço curto do

cromossomo 6 e possui 14 éxons (fonte: NCBI. Acessado em 17/11/2014. Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1432](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1432)).

Conforme Wagner e Nebreda (2009), embora a ativação do p38 $\alpha$  normalmente seja associada a funções antiproliferativas, estudos indicam que o mesmo pode regular positivamente a proliferação celular em algumas linhagens celulares. Nebreda e Porras (2000) sugeriram que, em nível molecular, os efeitos antagonistas do p38 $\alpha$  na proliferação celular estariam provavelmente atribuídos a diferentes níveis de atividade das quinases, juntamente com sua relação com diferentes vias celulares.

A cascata do p38 (Figura 3) é geralmente ativada pelo estresse ambiental, incluindo choque térmico, osmótico, e oxidativo. É também ativada por citocinas inflamatórias e infecções virais. Quinases que agem diretamente sobre o p38 incluem MKKs 3 e 6, que por sua vez são ativadas por MEKKs (*MAPK/ERK kinase kinases*), MLKs (*mixed lineage kinases*) e ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*). Fatores de transcrição afetados pela família p38 incluem Stat1 (*signal transducer and activator of transcription 1*), ELK-1 (membro da família de oncogenes ETS), ATF-2 (*activating transcription factor 2*) e CHOP (*C/EBP homologous protein*) (AURELIAN, 2005). O p38 responde ao sinal tornando-se rapidamente ativado pela dupla fosforilação do motivo treonina-glicina-tirosina (WILSON et al., 1996).

Embora quantidade substancial de dados demonstre a importância do p38 na inflamação, evidências crescentes demonstram que ela está associada a várias respostas celulares relacionadas ao câncer (YONG et al., 2009). A inflamação crônica tem sido associada ao aumento da sobrevivência de células cancerosas e à indução da invasão e angiogênese. Evidências para o controle destes processos pelas vias JNK e p38-MAPK baseiam-se no fato de que estas enzimas regulam a atividade e expressão de mediadores inflamatórios chave, incluindo citocinas e proteases que podem afetar a progressão do câncer (WAGNER; NEBRED, 2009). A ativação da via p38-MAPK pode também ser responsável pela resistência à quimioterapia em células gástricas cancerosas (GUO et al., 2008).

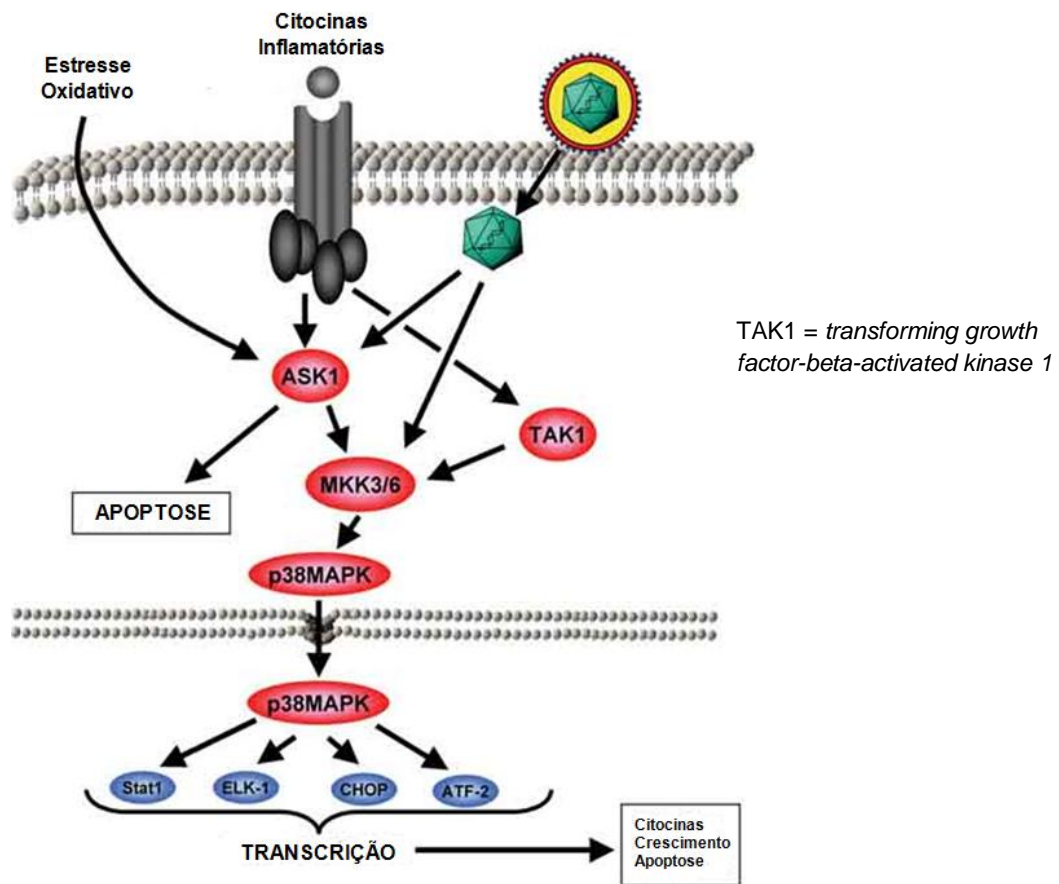


Figura 3 - Representação da via p38 MAPK.

Fonte: Adaptado, pelo autor, de Aurelian (2005).

#### 4.6 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) é uma poderosa ferramenta para avaliar expressão gênica devido a sua sensibilidade e especificidade (KUBISTA et al., 2006). A qPCR permite a amplificação, por meio de enzimas, de sequências definidas de RNA, podendo ser usado para comparar os níveis de RNAm, caracterizar seus padrões de expressão, discriminar entre RNAm bastante relacionados e para analisar a estrutura do RNA. O método de qPCR em tempo real trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de qPCR por fluorescência (BUSTIN, 2000).

O uso da qPCR para comparar níveis de RNAm entre biópsias de diferentes indivíduos e estados patológicos requer normalização cuidadosa. Um gene de

referência deve ser, idealmente, transcrito constantemente por todos os tipos celulares independentemente de condições experimentais, de forma a evitar interpretações equivocadas dos efeitos biológicos nos estudos de expressão gênica (DHEDA et al., 2004). Genes constitutivos comumente utilizados devem ser estáveis e seguros em vários tecidos, mas na prática frequentemente isto não acontece, como alguns estudos tem demonstrado (RUBIE et al., 2005; GUO et al., 2013). Wisnieski e colaboradores (2013) validaram genes de referência para amostras gástricas em uma população brasileira, porém o estudo considerou apenas amostras de adenocarcinoma.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Delineamento do Estudo**

Esta pesquisa é classificada como transversal e experimental.

### **5.2 Amostra de Estudo**

Fizeram parte da amostra, pacientes submetidos ao exame de endoscopia digestiva alta, realizado pelo médico gastroenterologista participante do estudo no Hospital Bruno Born, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil. No momento anterior ao exame foi realizada uma entrevista onde foram apresentados os objetivos da pesquisa. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão, e aqueles que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e realizaram biópsia durante o exame de endoscopia digestiva alta, conforme critério médico. Foram excluídos os indivíduos que não apresentavam condições de compreender ou assinar o TCLE que apresentavam distúrbios de coagulação ou outro quadro clínico que impedisse a realização de biópsia gástrica pelo médico gastroenterologista; que estavam fazendo uso de medicamentos anti-inflamatórios, antibióticos e bloqueadores de ácido estomacal (ex.: omeprazol, esomeprazol, pantoprazol); que possuíam histórico de neoplasias.

### **5.3 Ambiente de Pesquisa**

As biópsias foram coletadas no Hospital Bruno Born através do exame de endoscopia digestiva alta pela equipe de pesquisa junto ao médico gastroenterologista participante do estudo e, após, uma delas foi direcionada para o



Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário UNIVATES para análise da expressão gênica. As amostras restantes foram direcionadas para exame anatomopatológico de rotina em laboratório prestador de serviço terceirizado. Parte das análises foi realizada, em colaboração, no Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral do departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **5.4 Aspectos Éticos**

A presente pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário UNIVATES, conforme parecer consubstanciado número 353.624. Em concordância ao disposto na Resolução 466/2012 (Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos) e 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, todos os indivíduos participantes foram informados a respeito dos objetivos e procedimentos da pesquisa, e confirmaram participação por livre e espontânea vontade através de assinatura no TCLE (Apêndice A).

#### **5.5 Coleta das Amostras**

No exame de endoscopia digestiva alta, pelo menos três fragmentos de tecido gástrico (aproximadamente 3 mm) da mesma localidade (pequena curvatura do antro gástrico – Figura 4) foram coletados: um dos fragmentos foi direcionado para a análise de expressão gênica pelos pesquisadores, outro para a realização do Teste Rápido de Urease (RNA Laboratórios, Cascavel, PR, Brasil), e o terceiro foi direcionado para realização do exame anatomopatológico. O tecido direcionado à pesquisa foi separado e colocado em um tubo com solução preservadora de RNA (RNA *Latter*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para posterior extração de RNA e análise de expressão gênica.



Figura 4 – Pequena curvatura do antro gástrico. Fotografia realizada após coleta de biópsia, durante o exame de endoscopia digestiva alta. Fonte: Dados da pesquisa.

Além do material biológico, foram coletadas as seguintes informações utilizando um questionário: data de nascimento, sexo, diagnóstico prévio de *H. pylori*, hábitos (consumo diário de álcool, tabagismo), laudos de diagnóstico da endoscopia e exame anatomopatológico (Apêndice B).

### 5.6 Diagnóstico de Infecção por *H. pylori* e Análise Histológica

O teste rápido de urease é baseado no princípio de que a enzima urease produzida pela *H. pylori* hidrolisa a ureia formando amônia (BERRY; SAGAR, 2006). Um fragmento de biópsia é introduzido logo após a coleta em um tubo contendo um meio com ureia. O consequente aumento no pH do meio pela produção de amônia é detectado por um indicador de vermelho fenol, modificando a cor do meio e indicando a presença da bactéria (Figura 5). Quando a mudança de cor ocorre nas primeiras 24 horas o teste é considerado positivo (ORNELLAS et al, 2000). O diagnóstico da *H. pylori* pelo teste rápido de urease foi confirmado com o resultado da coloração de Giemsa modificado (WABINGA, 2002) realizado pelo laboratório de rotina. As amostras foram classificadas conforme o resultado da análise histológica, de acordo com a classificação de Sydney (DIXON et al., 1996). Os grupos foram divididos conforme o grau de severidade das alterações encontradas no exame anatomopatológico (Figura 6).



Figura 5 - Teste rápido de urease. Na foto duas amostras, uma negativa (à esquerda) e outra positiva para *H. pylori* (à direita). Fonte: Dados da pesquisa.

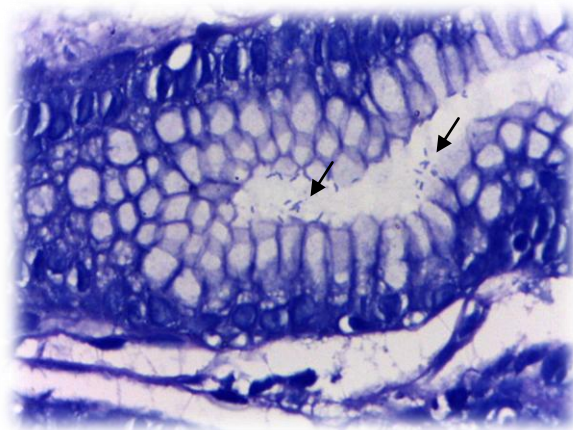


Figura 6 - Exame anatomopatológico. No detalhe, *H. pylori* identificada através da coloração de Giemsa (Microscopia Óptica 1000 X). Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.7 Análise da Expressão Gênica

### 5.7.1 Extração do RNA

Aproximadamente 03 mm de tecido obtido de biópsia da mucosa gástrica foi processado em homogeneizador tipo turrax de tecidos com o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O método de extração de RNA total pelo Trizol é uma adaptação do método original descrito por Chomczynski e Sacchi (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). A solução contendo o homogeneizado foi transferida para tubos de microcentrífuga e incubada por 5 minutos a 15-30°C.

Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, foi incubada por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugada a 12000 xg por 15 minutos a 4°C. A amostra foi separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para tubos novos, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool 70% (0,5 mL/mL de Trizol). A fase orgânica foi congelada a -80 °C para estudos posteriores com DNA. A partir deste momento o RNA foi purificado utilizando-se o kit RNAspin Mini (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) seguindo instruções do próprio fabricante, obtendo-se um volume final de 20 µL.

### 5.7.2 Quantificação do RNA

A concentração do RNA foi avaliada por espectrofotometria utilizando-se o aparelho L-Quant (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil), utilizando-se 2 µL da solução obtida na extração. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias a 260 e 280 nm era próxima a 2,0.

### 5.7.3 Síntese do DNA Complementar (DNAc)

A síntese do DNAc foi feita a partir de 1 µg de RNA total, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) complementares à cauda poli-A característica do RNA mensageiro (RNAm), produzindo um DNAc mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. A síntese foi realizada utilizando-se o protocolo do Kit Superscript III First Strand Supermix (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Ao final da síntese foi obtido 20 µL de DNAc armazenado a -20°C até a amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Para testar a qualidade da extração e síntese do DNAc, realizou-se a PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional para o gene *B2M* (beta-2-microglobulina) com posterior eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (Figura 7).

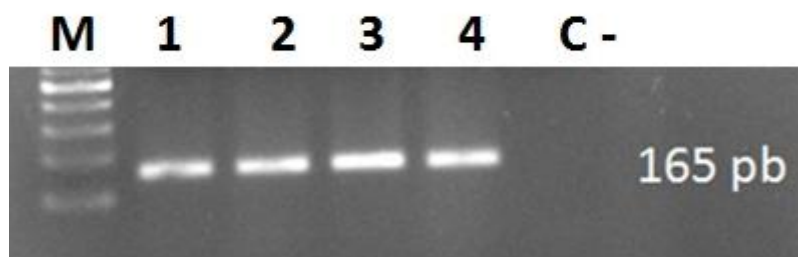


Figura 7 - Gel de agarose representativo da amplificação do gene *B2M*. M = marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (New England Biolabs, UK).

#### 5.7.4 PCR Quantitativa em Tempo Real

A análise da expressão gênica foi feita pela técnica de qPCR em tempo real utilizando o corante Sybr Green (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Para cada gene do estudo foi gerada uma curva de padronização pelo software StepOne versão 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) obtida através de reações de qPCR feitas a partir de diluições seriadas de um *pool* DNAC (4 a 0,0064ng) de mucosa gástrica sem contaminação por *H. pylori*. Cada ponto de diluição da curva foi analisado em triplicata, junto com as amostras. O momento em que ocorre o aumento exponencial da fluorescência pelo corante utilizado é definido como o CT (ciclo limiar, que é inversamente proporcional ao log da quantidade de DNAC (ng) (HIGUCHI et al., 1993).

Para evitar variação entre as amostras, visto que elas foram obtidas de diferentes indivíduos, foi amplificado um gene de referência para a normalização dos resultados dos genes de interesse. O gene de referência (conhecido também como normalizador ou constitutivo) é um gene idealmente expresso em níveis constantes entre os diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento, não sofrendo alteração pelos tratamentos experimentais. Portanto, a análise do melhor gene de referência para as amostras estudadas torna-se necessária a fim de garantir a confiabilidade dos resultados.

#### 5.7.4.1 Protocolo para Análise dos Genes de Referência

Cinco genes de referência comumente utilizados em estudos de expressão gênica foram avaliados em relação à estabilidade frente às amostras coletadas. Os oligonucleotídeos (*primers*) foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Endócrina e Tumoral da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos oligonucleotídeos utilizados para seleção do gene de referência.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho fragmento (pb)
<i>ACTB</i> <sup>a</sup>		
<i>sense</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	140
<i>antisense</i>	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	
<i>GAPDH</i> <sup>a</sup>		
<i>sense</i>	CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG	133
<i>antisense</i>	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGC	
<i>B2M</i> <sup>a</sup>		
<i>sense</i>	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	165
<i>antisense</i>	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	
<i>SDHA</i> <sup>a</sup>		
<i>sense</i>	TGGTTGTCTTTGGTCGGG	85
<i>antisense</i>	GCGTTTGGTTTAATTGGAGGG	
<i>HPRT1</i> <sup>a</sup>		
<i>sense</i>	AGATGGTCAAGGTCGCAAG	128
<i>antisense</i>	GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC	

<sup>a</sup>Souza et al, 2013. *ACTB* = beta actina; *GAPDH* = glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; *B2M*= $\beta$ -2-microglobulina; *SDHA* = succinate dehydrogenase complex Subunit A, flavoprotein (*Fp*); *HPRT1* = hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1.

A amplificação do DNAc e a quantificação relativa foi realizada utilizando-se o sistema de qPCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando o Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em um volume total de 25  $\mu$ L [(12,5  $\mu$ L de SuperMix, 0,5  $\mu$ L de Rox Dye 50  $\mu$ mol/L, 0,3  $\mu$ L de cada *primer* (10  $\mu$ mol/L *sense* and 10  $\mu$ mol/L *antisense*), 9,4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O e 2,0  $\mu$ L de template de DNAc diluído 20 vezes]. Medidas em duplicata foram realizadas, com o seguinte protocolo: incubação

inicial por 3 min a 94 °C, seguida por 45 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 55 °C e 30 s de extensão a 60 °C.

Para avaliar a especificidade da reação foi realizada a curva de dissociação para cada par de *primers* com análise da temperatura de *melting* de cada gene (Anexo A).

#### 5.7.4.2 Análise dos Genes de Interesse

Os *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNAc específicos para o *NFKB1* e *p38α* foram desenhados a partir da sequência publicada de cada gene utilizando-se a ferramenta online Primer3 (ROZEN; SKALETSKI, 2000), obedecendo a alguns critérios: 18 a 30 nucleotídeos; posicionamento preferencial dos oligonucleotídeos em áreas de transição intron-éxon para inviabilizar a amplificação indesejada de DNA genômico; proporção de G-C entre 50 e 60%; extremidade 3' preferencialmente ocupada por C ou G para fortalecer a hibridização neste ponto crítico; evitar sequências complementares entre o par de *primers* para inibir a formação de dímeros. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados por Invitrogen do Brasil, Ltda.

A tabela 2 resume a sequência dos oligonucleotídeos de interesse deste estudo, bem como o tamanho dos fragmentos de DNAc amplificados.

Tabela 2 - Características dos oligonucleotídeos dos genes de interesse.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho fragmento (pb)	Referência
<i>NFKB1</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	ACACCGTGTAACCAAAGCC CAGCCAGTGTGTGATTGCT	209	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3">http://bioinfo.ut.ee/primer3</a>
<i>p38α</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	CAGTGGGATGCATAATGGCC GCATCTTCTCCAGCAAGTCG	243	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3">http://bioinfo.ut.ee/primer3</a>
<i>TNF-α</i> <i>sense</i> <i>antisense</i>	CCCTGGTATGAGCCCATCTATC AAAGTAGACCTGCCAGACTCG	120	Abbas et al., 2014

A amplificação do DNAc e a quantificação relativa foi realizada utilizando-se o sistema de qPCR em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em um volume total de 25 µL. A tabela 3 demonstra as quantidades de reagentes padronizadas para cada gene de forma a obter melhor eficiência de reação. Foram realizadas amplificação e leitura de cada amostra em duplicata, com o seguinte protocolo para todos os genes: incubação inicial por 3 min a 94 °C, seguida por 45 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 30 s de anelamento a 55 °C e 30 s de extensão a 60 °C.

Tabela 3 - Quantidade de reagentes padronizada e utilizada para cada reação de qPCR dos genes de interesse.

Reagente	Gene		
	<i>NFKB1</i>	<i>p38α</i>	<i>TNF-α</i>
SuperMix	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
Rox Dye 50 µmol/L	1 µL	1 µL	1 µL
<i>Primer</i>			
<i>sense</i> 10 µmol/L	0,3 µL	0,5 µL	0,3 µL
<i>antisense</i> 10 µmol/L	0,3 µL	0,5 µL	0,3 µL
H <sub>2</sub> O	8,9 µL	8,5 µL	6,9 µL
DNAc (1:20)	2 µL	2 µL	4 µL
Total	25 µL	25 µL	25 µL

Para confirmar a especificidade da reação, foi realizada a curva de dissociação para cada par de *primers* com a análise da temperatura de *melting* de cada gene (Anexo A).

## 5.8 Análise de Dados

Os dados foram tabulados e analisados com estatística descritiva empregando-se o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, IBM Inc.) versão 20.0. Foram aplicados testes estatísticos adequados conforme a distribuição encontrada, utilizando-se o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) versão 5.03. Para verificar normalidade dos valores de expressão



gênica obtidos, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e para a comparação entre mais de dois grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%, sendo considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ . Para a análise do gene de referência foi utilizado o algoritmo NormFinder (ANDERSON; JENSEN; ORNTOFT, 2004) para Microsoft Excel (Microsoft Inc.), que calcula automaticamente a estabilidade da expressão de cada gene estudado. Para avaliar o poder estatístico foi utilizado o software WinPepi (ABRAMSON, 2011) versão 11.43.

## 6 RESULTADOS

Participaram do estudo 100 pacientes, sendo 37 do sexo masculino e 63 do sexo feminino. As idades variaram de 19 a 81 anos, sendo a média de  $46,02 \pm 14,45$  (média  $\pm$  DP) anos.

### 6.1 Classificação Quanto à Infecção por *H. pylori*

As amostras (n=100) foram classificadas como *H. pylori* positivas (HP+) ou negativas (HP-), segundo o teste de urease e o exame anatomopatológico. A tabela 4 demonstra as principais características da população do estudo quanto à infecção por *H. pylori*.

Tabela 4 – Principais características da população do estudo em relação à contaminação por *H. pylori*.

	HP+ (n=29)	HP- (n=71)
Idade (anos)		
Média $\pm$ DP	46,45 $\pm$ 13,02	45,85 $\pm$ 15,09
Variação	22 - 64	19 – 81
Tratamento prévio para HP <sup>a</sup>	6 (20,69%)	23 (32,39%)
Tabagismo <sup>a</sup>	4 (13,79%)	5 (7,04%)
Uso de álcool <sup>a</sup>	3 (10,35%)	3 (4,23%)

<sup>a</sup>Valores expressos como número de casos e (%).

Dos 71% diagnosticados como negativos para *H. pylori*, 23% já haviam realizado tratamento para erradicação da bactéria em algum momento da vida. Logo, 52% da população estudada apresentou histórico de infecção por *H. pylori*.

## 6.2 Classificação Quanto à Análise Anatomopatológica

As amostras foram classificadas, segundo o exame anatomopatológico, como normal, gastrite crônica não ativa (GCNA), gastrite crônica ativa (GCA) e com a presença de metaplasia intestinal (MI), conforme demonstra a tabela 5.

Tabela 5 – Principais características da população do estudo em relação à classificação anatomopatológica.

	Normal (n=19)	GCNA (n=46)	GCA (n=27)	MI (n=8)
Idade (anos)				
Média ± DP	43,95 ± 14,98	45,65 ± 15,39	45,30 ± 12,74	55,50 ± 11,67
Variação	21 – 75	19 – 81	22 – 64	35 – 70
Tratamento prévio para HP <sup>a</sup>	5 (26,32%)	13 (28,26%)	6 (22,22%)	5 (62,5%)
<i>H. pylori</i> positivo <sup>a</sup>	0	0	27 (100%)	2 (25%)
Tabagismo <sup>a</sup>	1 (5,26%)	1 (2,17%)	3 (11,11%)	4 (50%)
Uso de álcool <sup>a</sup>	0	0	2 (7,4%)	4 (50%)

<sup>a</sup>Valores expressos como número de casos e (%).

Todas as amostras classificadas como gastrite crônica ativa foram positivas para *H. pylori*. Do grupo metaplasia intestinal, 25% (n=2) eram positivas para *H. pylori*. No entanto, apenas 12,5% (n=1) não possuía relato de infecção prévia por *H. pylori*. Os grupos classificados como normal e gastrite crônica não ativa foram diagnosticados como negativos para a bactéria.

### 6.3 Análise do Gene de Referência

Para escolha do gene de referência mais estável a ser utilizado na análise dos genes de interesse 39 amostras foram avaliadas, das quais 11 foram classificadas como normal, 11 como gastrite crônica não ativa, 12 como gastrite crônica ativa e 5 como metaplasia intestinal.

A estabilidade da expressão de um gene é indicada pelo seu valor de estabilidade. Quanto menor o valor, mais estável o gene é, sendo considerável estável quando o valor for abaixo de 0,15. Os valores de estabilidade obtidas após análise pelo NormFinder estão demonstrados na tabela 6. A análise demonstrou o *SDHA* como sendo o gene mais estável e também possuindo a menor variação intergrupos. A combinação mais estável de dois genes para uso como normalizador foi a do *SDHA* + *ACTB* (0.112).

Tabela 6 - Classificação dos genes de referência analisados para normalização das reações de qPCR em amostras de mucosa gástrica, de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelo NormFinder.

Ranking	Gene	Valor de estabilidade
1	<i>SDHA</i>	0.149
2	<i>ACTB</i>	0.180
3	<i>HPRT1</i>	0.231
4	<i>GAPDH</i>	0.265
5	<i>B2M</i>	0.270

Fonte: dados da pesquisa.

As figuras 8 e 9 mostram as variações intra e intergrupos, de acordo com a análise pelo NormFinder.

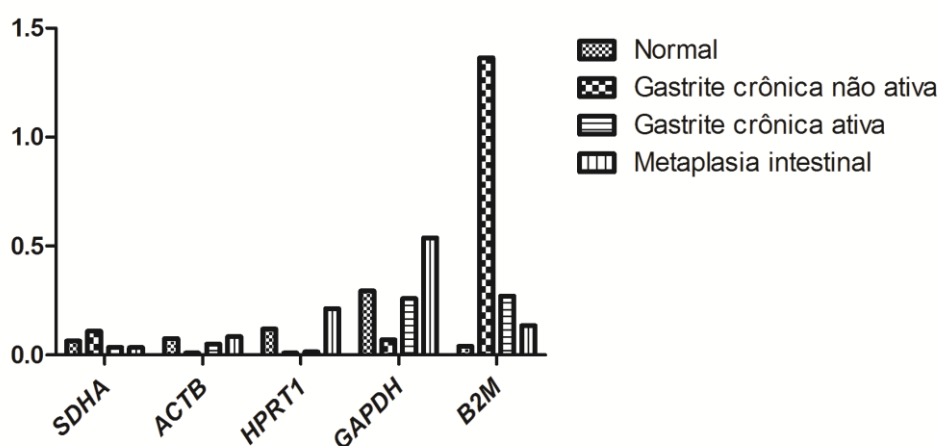


Figura 8 - Variação intragrupos, conforme análise pelo NormFinder.

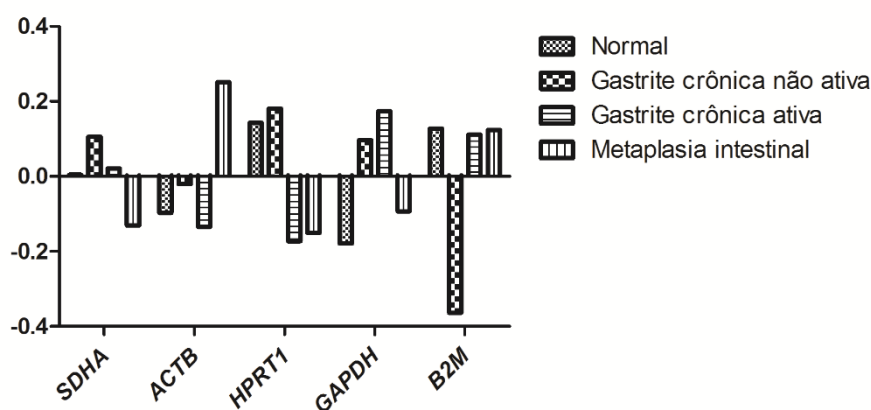


Figura 9 - Variação intergrupos, conforme análise pelo NormFinder.

#### 6.4 Análise da Expressão de *NFKB1*, *p38α* e *TNF-α*

Para análise dos genes de interesse foram utilizadas 79 amostras, sendo 27 (34,18%) positivas e 52 (65,82%) negativas para *H. pylori*. Quanto à classificação por grupos, 17 (21,52%) foram classificadas como normal, 29 (36,71%) como gastrite crônica não ativa (GCNA), 25 (31,65%) como gastrite crônica ativa (GCA), e 8 (10,12%) como metaplasia intestinal (MI). O *SDHA* foi o gene de referência escolhido para ser usado como normalizador, de acordo com os resultados de nossas análises.

Para verificação do tamanho dos *amplicons* dos genes de interesse e do gene de referência, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, conforme demonstrado na figura 10.

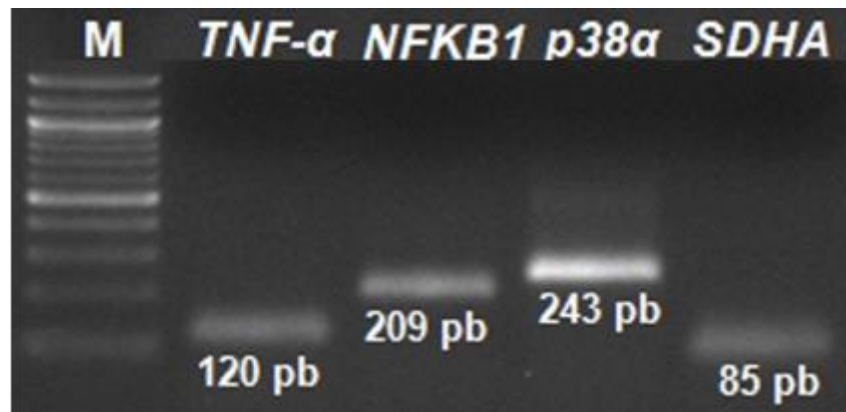


Figura 10: Representação dos *amplicons* para cada gene estudado. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M = marcador de 100 pares de base (pb).

Para o *NFKB1*, conforme ilustram as figuras 11 e 12, não foram encontradas diferenças significativas nas comparações entre os grupos em relação à contaminação por *H. pylori* e análise histológica.

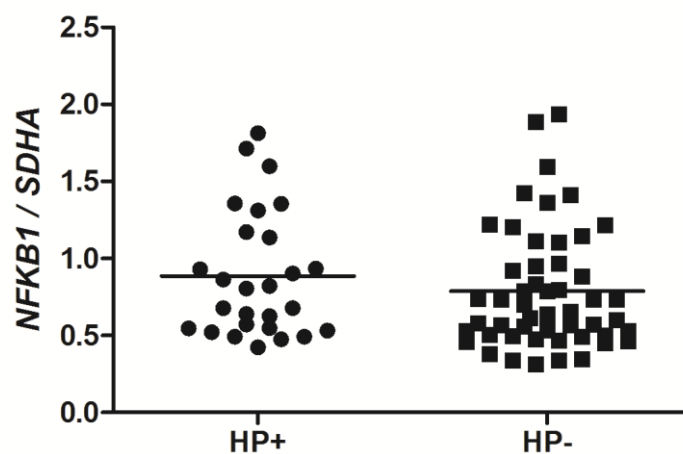


Figura 11 - Níveis de expressão (RNAm) de *NFKB1* em amostras de mucosa gástrica humana, conforme contaminação por *H. pylori*. Teste de Mann-Whitney ( $p > 0.05$ ).

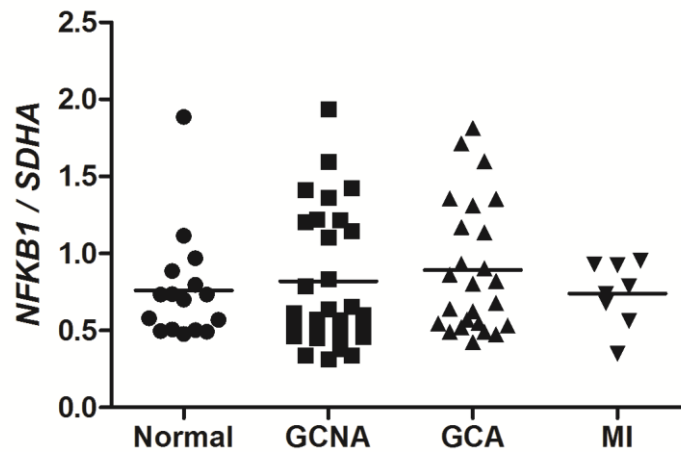


Figura 12 - Níveis de expressão (RNAm) de *NFKB1* em amostras de mucosa gástrica humana, conforme classificação histológica. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ( $p > 0.05$ ).

Para o *p38α*, conforme ilustram as figuras 13 e 14, também não foram encontradas diferenças significativas nas comparações entre os grupos em relação à contaminação por *H. pylori* e análise histológica.

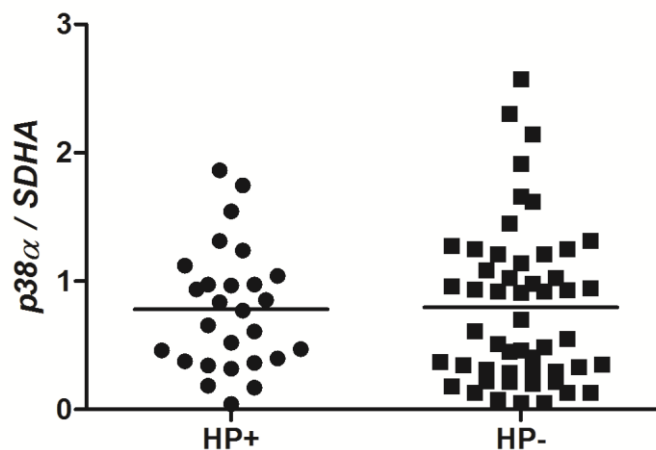


Figura 13 - Níveis de expressão (RNAm) de *p38α* em amostras de mucosa gástrica humana, conforme contaminação por *H. pylori*. Teste de Mann-Whitney ( $p > 0.05$ ).

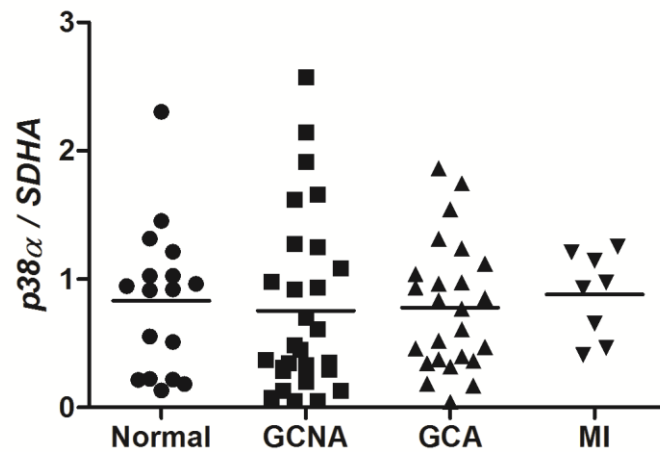


Figura 14 - Níveis de expressão (RNAm) de  $p38\alpha$  em amostras de mucosa gástrica humana, conforme classificação histológica. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ( $p > 0.05$ ).

Para o  $TNF-\alpha$ , conforme ilustram as figuras 15 e 16, foram encontradas diferenças significativas nas comparações entre os grupos em relação à contaminação por *H. pylori* e análise histológica.

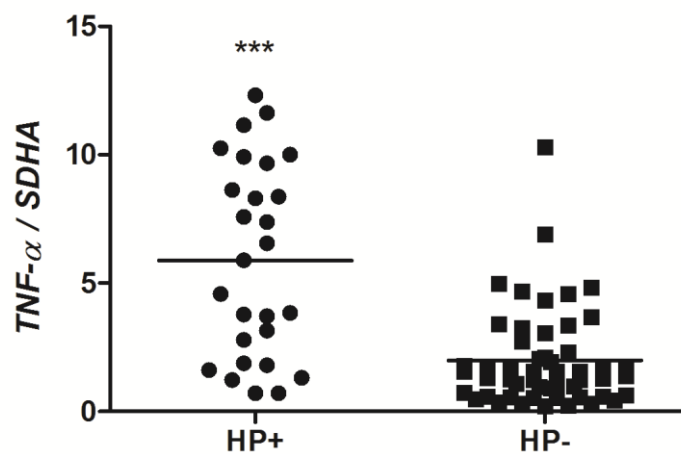


Figura 15 - Níveis de expressão (RNAm) de  $TNF-\alpha$  em amostras de mucosa gástrica humana, conforme contaminação por *H. pylori*. Teste de Mann-Whitney (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ).



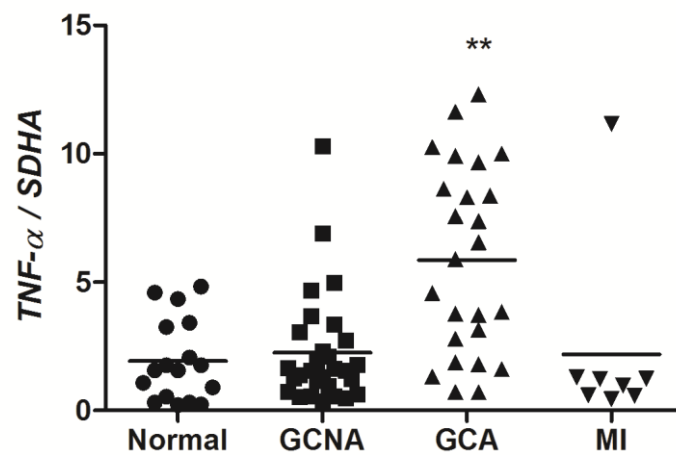


Figura 16 - Níveis de expressão (RNAm) de *TNF-α* em amostras de mucosa gástrica humana, conforme classificação histológica. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (\*\*  $p < 0.01$ ).

Para testar o poder estatístico das diferenças encontradas entre os grupos para o *TNF-α*, utilizou-se o software WinPepi (ABRAMSON, 2011) versão 11.43. O poder da diferença entre os grupos *H. pylori* positivo e negativo foi de 100%. Em relação à diferença entre o grupo gastrite crônica ativa e os grupos normal, gastrite crônica não ativa e metaplasia intestinal, o poder estatístico encontrado foi de 98,22%, 99,20% e 66,83%, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Este estudo analisou biópsias gástricas obtidas por endoscopia digestiva alta de uma população do interior do Rio Grande do Sul, Brasil. Para o diagnóstico de infecção por *H. pylori* foi realizado o Teste Rápido de Urease, tendo este diagnóstico sido confirmado posteriormente pela análise histológica, onde também foram obtidas informações sobre a presença/ausência de infiltrado inflamatório e lesão gástrica. Através dos resultados obtidos, podemos associar a infecção pela *H. pylori* com a inflamação ativa do tecido gástrico, uma vez que 100% das amostras positivas para a bactéria apresentaram presença de inflamação ativa, conforme laudo do exame anatomopatológico.

Como o foco desta pesquisa foi o estudo da expressão gênica, o número limitado de amostras não favoreceu um estudo epidemiológico sobre os índices de contaminação por *H. pylori*, bem como a prevalência de lesões gástricas encontradas em nossa população de estudo. No entanto, Muller e colaboradores (2007) realizaram estudo com 2019 biópsias obtidas de um serviço de referência da região central do Estado do Rio Grande do Sul, obtendo uma taxa de infecção por *H. pylori* de 76%. Este valor acima da estimativa mundial pode ser explicado devido às amostras serem coletadas de participantes com indicação para o exame de endoscopia digestiva alta, ou seja, já apresentarem manifestações clínicas.

O tipo de lesão mais severa encontrado em nossas amostras foi a metaplasia intestinal. Apesar de apenas 25% das amostras com este tipo de lesão terem apresentado diagnóstico positivo para a infecção por *H. pylori*, apenas uma amostra

(12,5%) não apresentou histórico de contaminação pela bactéria em algum momento da vida. Porém, nossa hipótese é de que a presença desta lesão nesta amostra possa estar associada com o uso diário de bebida alcoólica, conforme informações coletadas pelo questionário, o que pode ser um fator agravante para o aparecimento de doença gástrica. Embora a *H. pylori* seja reconhecida atualmente como a principal causa de gastrite crônica, Ddine e colaboradores (2012) relatam que fatores como tabagismo, alcoolismo, ansiedade, estresse, nutrição inadequada, e estilo de vida, podem contribuir para o início das manifestações clínicas.

Para o início das análises de expressão gênica, foi necessária a escolha de um gene de referência para a normalização dos dados de expressão dos genes de interesse. Considerando que cada experimento é único devido as suas características individuais, atualmente é aceito que não há um gene de referência universal para normalização de qPCR, sendo importante validar genes candidatos para cada situação experimental (SANTIN et al., 2013). O gene de referência ideal deve ser transcrito constantemente sob todas as condições experimentais no intuito de evitar falha na interpretação dos efeitos biológicos em estudos de expressão gênica (DHEDA et al., 2004).

Neste estudo foram avaliados cinco candidatos a gene de referência para amostras de mucosa gástrica humana obtidas de participantes submetidos à endoscopia digestiva alta. O software NormFinder foi escolhido para comparar os genes devido à sua qualidade de estimar variações inter e intragrupos e então combiná-los em um valor de estabilidade (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOF, 2004). O valor próximo de zero indica maior estabilidade da expressão gênica.

Considerando um valor de corte de 0,15 como aceitável para estabilidade do gene de referência (PEREZ; TUPAC-YUPANQUI; DUNNER, 2008), o presente estudo demonstrou o *SDHA* como gene de escolha para a normalização das reações de qPCR quando comparado ao *ACTB*, *B2M*, *HPRT1* e *GAPDH*. Ademais, a combinação dos genes *SDHA* e *ACTB* demonstrou um melhor valor de estabilidade, representando a melhor combinação de dois genes para a normalização da qPCR de nossas amostras de estudo.

Embora o *ACTB* tenha demonstrado uma baixa variação intragrupo (similar ao *SDHA*), sua alta variação intergrupos aumentou seu valor de estabilidade, não permitindo-nos sugerir este gene como a melhor referência para as condições demonstradas neste trabalho. O *ACTB* tem sido tradicionalmente recomendado como gene de referência para quantificar níveis de expressão em tumores. No entanto, evidências demonstram que o *ACTB* encontra-se desregulado no câncer gástrico e em muitos outros tumores (GUO et al., 2013). Em nosso estudo a análise foi realizada em tecidos não neoplásicos, no entanto a variação intergrupo do *ACTB* foi maior no grupo com a presença de metaplasia intestinal, que é considerada uma lesão precursora de neoplasia (MIAO et al., 2007), afetando o valor de estabilidade do gene. Um estudo brasileiro com amostras e linhagens celulares gástricas normais e com adenocarcinoma (WISNIESKI et al., 2013) encontrou o *ACTB* como melhor gene de referência, porém o *SDHA* não foi incluído na análise.

O *GAPDH* é um dos genes de referência mais comumente utilizados, e muitas das mais importantes revistas científicas consideram seu uso devido à comumente ele ser referido como um “clássico” (de JONGE et al., 2007). Alguns estudos de expressão gênica com mucosa gástrica humana utilizam este gene como referência (ZUK et al., 2012; de SOUZA et al., 2013), mesmo com a demonstração de que há um aumento na expressão do *GAPDH* no câncer gástrico quando comparado com o tecido normal (RUBIE et al., 2005). Nosso estudo demonstrou que o *GAPDH* apresentou alta variabilidade entre os grupos, não sendo recomendado para o uso como referência nas condições descritas.

Esta não é a primeira vez que o *SDHA* é considerado adequado para ser utilizado como gene de referência. Outros estudos, em diferentes condições, encontraram o *SDHA* como o melhor gene de referência quando comparado a outros frequentemente utilizados (SOUZA et al., 2013; BALOGH et al., 2008; GUR-DEDEOGLU et al., 2009). Isto sugere que, de acordo com os resultados deste estudo, *SDHA* é um gene a ser considerado para ser utilizado como referência devido à sua estabilidade, além de recomendarmos a inclusão deste gene em mais estudos para seleção de genes de referência com diferentes amostras e condições experimentais.

Quanto aos genes de interesse, em nosso estudo o *TNF- $\alpha$*  demonstrou estar com sua expressão aumentada no grupo de amostras *H. pylori* positivas, independentemente do sexo. O grupo classificado como gastrite crônica ativa, quando comparado aos demais, também apresentou aumento na expressão de *TNF- $\alpha$* . Isto pode ser explicado devido à totalidade das amostras pertencentes a este grupo terem sido classificadas como positivas para a infecção pela bactéria. Estes resultados corroboram com estudo publicado por Pimentel-Nunes e colaboradores (2012), que encontrou níveis aumentados de RNAm de *TNF- $\alpha$*  em biópsias gástricas infectadas por *H. pylori*. É sabido que a infecção por *H. pylori* induz à inflamação do estômago associada à produção de citocinas inflamatórias como o *TNF- $\alpha$* , de acordo com resultados de estudos que demonstraram níveis aumentados desta citocina em pacientes positivos para *H. pylori* (CRABTREE et al., 1991; ZHAO et al., 2010). No entanto, estudo de Abbas e colaboradores (2014), realizado com pacientes portadores de cirrose hepática, não encontrou diferença estatística nos níveis de expressão de *TNF- $\alpha$*  ao comparar grupos *H. pylori* positivo e negativo, e grupos com gastropatia moderada e severa.

Conforme Suganuma e colaboradores (2006), devido ao *TNF- $\alpha$*  ser uma citocina chave na promoção tumoral, é importante esclarecer como estas citocinas pró-inflamatórias induzidas pela infecção por *H. pylori* estão envolvidas no desenvolvimento do câncer gástrico. Estudos demonstraram a presença de gene codificador da proteína indutora de *TNF- $\alpha$*  (*Tnp $\alpha$* ) no genoma da *H. pylori*, que age como um fator carcinogênico devido à forte indução da expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  e ativação de *NF- $\kappa$ B* (SUGANUMA et al., 2001; SUGANUMA et al., 2005).

Quanto à expressão gênica de *NF- $\kappa$ B*, não encontramos diferença estatística significativa entre os grupos analisados, da mesma forma que o estudo de Pimentel-Nunes e colaboradores (2012). Naito e Yoshikawa (2002) relataram que o *H. pylori* ativa o gene *NF- $\kappa$ B* de células epiteliais da mucosa gástrica tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ademais, Huang e colaboradores (2013) demonstraram que o *H. pylori* induz a fosforilação das proteínas *I $\kappa$ B $\alpha$*  e *RelA* (p65) e a consequente translocação nuclear desta última, sendo o *H. pylori* um ativador da via de sinalização do *NF- $\kappa$ B*. Tendo em vista os resultados do nosso estudo, não podemos afirmar que a via do *NF- $\kappa$ B* não possua relação com os níveis elevados de expressão do *TNF- $\alpha$* , justamente em

função de que não podemos, com os dados coletados, comprovar os níveis de fosforilação e, conseqüentemente, ativação das proteínas envolvidas nesta via. Embora não tenhamos encontrado diferenças nos níveis de RNAm do *NF-κB*, mais estudos são necessários, a nível proteico, para verificar a presença e ativação destas proteínas.

Ferrand e colaboradores (2011) demonstraram, em células gástricas epiteliais de camundongos *in vitro*, aumento nos níveis de expressão do *TNF-α* em resposta à infecção por *H. pylori*. Este aumento esteve relacionado à ativação da via do NF-κB com a translocação nuclear do p65. O mesmo estudo demonstrou a relação da contaminação por *H. pylori* com esta via e a relação desta com a migração de células tronco mesenquimais, o que pode estar relacionado com a patofisiologia e carcinogênese gástrica. Em nosso estudo, 87,5% das amostras com presença de metaplasia intestinal, considerada uma lesão precursora de neoplasia da mucosa gástrica, apresentaram histórico de infecção por *H. pylori*, o que sugere a participação desta bactéria no aparecimento destas lesões.

Kim, Seo e Kim (2003) demonstraram *in vitro* que a *H. pylori* induz a ativação do p38 MAPK, que reduz a expressão do gene MucA, responsável pela produção de muco, favorecendo a apoptose em células epiteliais gástricas. Seo, Kim e Lim (2013) concluíram que MAPKs, tais como ERK e p38, podem controlar a ativação de NF-κB em células epiteliais gástricas infectadas por *H. pylori*. No entanto, estes estudos foram realizados em nível de proteína, não analisando níveis de RNAm. Em nosso estudo não encontramos diferenças quanto à expressão do *p38* quanto ao RNAm. Para que o p38 se transloque até o núcleo e estimule fatores de transcrição, a mesma deverá estar fosforilada e, para detectar isto, estudos em nível proteico tornam-se necessários.

Dentre as isoformas do p38, esta pesquisa deteve-se no estudo do gene da p38α, por ser a isoforma mais abundante nos tecidos e também a mais estudada. No entanto, outra isoforma, p38δ, encontra-se principalmente em tecido endócrino (WANG et al., 1997), o que pode ser um alvo de estudo, tendo em vista a presença de células endócrinas no epitélio gástrico. O'Callaghan, Fanning e Barry (2014), em revisão, relatam a importância de estudar esta isoforma até então negligenciada,

pois há evidência de que a mesma possa agir tanto como um promotor quanto supressor tumoral.

O *H. pylori* é uma bactéria altamente heterogênea, com a sua virulência sendo variável geograficamente. Das populações com alta prevalência de infecção por *H. pylori*, algumas possuem alta incidência de câncer gástrico (ex.: Leste Asiático), enquanto outras não (ex.: África e Sul da Ásia). Isto é explicado, em parte, pela presença de diversos tipos de fatores de virulência da *H. pylori*, especialmente CagA, VacA e OipA (van DOORN et al., 1998; YAMAOKA et al., 1999; YAMAOKA et al., 2002; YAMAOKA, 2010). Com o método de extração de RNA utilizado nesta pesquisa, podemos também extrair o DNA tanto do tecido gástrico quanto bacteriano (este último, no caso, nas amostras positivas para *H. pylori*), a partir da fase orgânica restante. Como perspectiva futura, podemos avaliar a presença de genes responsáveis por fatores de virulência na bactéria, e a sua influência na expressão de genes relacionados a alterações precursoras de neoplasia na mucosa gástrica contaminada por *H. pylori*, além de detectar a virulência das cepas identificadas na população de estudo.

A gastrite crônica é uma doença de alta prevalência na população mundial, e sua relação com a infecção por *H. pylori* é bem descrita. Esta alteração, se não tratada, pode levar a complicações mais severas, inclusive câncer. O câncer gástrico é uma doença de alta mortalidade e representa um grande esforço em pesquisa para a busca de melhores tratamentos e sua prevenção. Entender o papel da inflamação crônica no desenvolvimento do câncer, bem como os agentes causadores deste processo, é de fundamental importância para evitar o estabelecimento de alterações precursoras desta temida patologia. O estudo do *H. pylori*, seus fatores de virulência, bem como sua resistência à terapia, são cruciais para a melhoria dos tratamentos que visam sua erradicação. Conhecer os genes relacionados às vias inflamatórias e proliferativas nas diversas populações pode favorecer a obtenção de diversos benefícios no tratamento e prevenção da doença gástrica, na tentativa de diminuir os efeitos adversos e aumentar a eficácia dos tratamentos atualmente empregados.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o *H. pylori* aumenta a expressão do *TNF- $\alpha$*  em nível de RNAm na mucosa gástrica humana, não afetando os níveis de expressão gênica do *NFKB1* e do *p38 $\alpha$* . A infecção por esta bactéria esteve também associada à gastrite crônica ativa e à presença de metaplasia intestinal na população estudada. Ainda, o *SDHA* foi classificado como o gene mais estável para as amostras coletadas, podendo ser utilizado como normalizador das reações de qPCR em estudos posteriores.

- O *H. pylori* esteve presente em todas as amostras classificadas como gastrite crônica ativa;
- A infecção por *H. pylori* esteve relacionada à presença de metaplasia intestinal, lesão precursora de neoplasia da mucosa gástrica;
- A expressão do *TNF- $\alpha$*  em nível de RNAm esteve significativamente aumentada nas amostras *H. pylori* positivas;
- Não houve diferença significativa na expressão de *NFKB1* e *p38 $\alpha$*  em nível de mRNA nos grupos estudados;
- O *SDHA* foi considerado o gene mais estável para as reações de qPCR nas amostras coletadas, quando comparado ao *ACTB*, *B2M*, *GAPDH* e *HPRT1*.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z.; YAKOOB, J.; USMAN, M.W.; SHAKIR, T.; HAMID, S.; JAFRI, W. Effect of *Helicobacter pylori* and its Virulence Factors on Portal Hypertensive Gastropathy and Interleukin (IL)-8, IL-10, and Tumor Necrosis Factor-alpha Levels. **Saudi J Gastroenterol**, v. 20, n. 2, p. 120-127, 2014. doi: 10.4103/1319-3767.129477.
- ABRAMSON, J.H. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v. 8, n.1, p. 1-9, 2011.
- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621, 2006. doi: 10.1016/j.bcp.2006.06.029.
- AGGARWAL, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. **Cancer Cell**, v.6, n.3, p. 203–8, 2004.
- AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 9, p. 745–56, 2003.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOF, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, p. 5245-50, 2004. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- AURELIAN, L. Cross talk of signaling and apoptotic cascades in the CNS: target for virus modulation. **Frontiers in Bioscience**, v.10, p. 2776-87, 2005. doi: 10.2741/1735.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 13, n. 2, p. 135–41, 2002.
- BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews**, v. 9, p. 361-71, 2009.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet**, v.357, p. 539–45, 2001.
- BALOGH, A.; PARAGH JR., G. et al. Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes. **J Photochem Photobiol B**, v. 93, n.3, p. 133-39, 2008.
- BERRY, V.; SAGAR, V. Rapid Urease Test to Diagnose *Helicobacter Pylori* Infection. **JK Science**, v.8, n.3, p. 86-88, 2006.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n.2, p. 169-93, 2000.

CAAMAÑO, J.; HUNTER, C.A. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clin Microbiol Ver**, v. 15, p. 414-29, 2002.

CLYNE, M.; DRUMM, B. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. **Infect Immun**, v. 61, p. 4051–57, 1993.

COELHO, L.G.; MAGUINILK, I; ZATERKA, S; PARENTE, J.M.; PASSOS, M.C.F.; MORAES-FILHO, J.P.P. 3rd Brazilian consensus on *Helicobacter pylori*. **Arq Gastroenterol**, 2013.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v.162, n. 1, p. 156-9, 1987.

CORREA, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Am J Surg Pathol**, v. 19, n. 1, p.37–43, 1995.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res**, v. 52, p. 6735–40, 1992.

CORREA, P.; HAENSZEL, W.; CUELLO, C.; TANNENBAUM S.; ARCHER, M. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet**, v. 2, p. 58-60, 1975.

CRABTREE, J. E.; SHALLCROSS, T. M.; HEATLEY, R. V.; WYATT, J. I. Mucosal tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. **Gut**, v. 32, p. 1473-77, 1991.

CUADRADO, A.; NEBRED, A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. **Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403–17, 2010.

CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 8, p. 1358-75, 2007.

DEZUTTER, G.S.; DAVIS, R.J. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 6168-73, 2001.

DDINE, L. C. et al. Fatores associados com a gastrite crônica em pacientes com presença ou ausência do *Helicobacter pylori*. **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 2, p. 96-100, 2012.

DHEDA, K.; HUGGETT, J.F.; BUSTIN, S.A.; JOHNSON, M.A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, v. 37, p. 112-14, 116, 118-19, 2004.

DIXON et al. Classification and Grading of Gastritis: The Updated Sydney System. **Am J Surg Pathol**, v.20, n. 10, p. 1161-81, 1996.

van DOORN, L.J. et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 115, p. 58-66, 1998.

ENDOSCOPIA Digestiva Alta. **Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva.**

Disponível em: <[http://www.sobed.org.br/web/site/unico.aspx?id\\_secao=72](http://www.sobed.org.br/web/site/unico.aspx?id_secao=72)>. Acesso em 16 de junho de 2013.

ESCOBAR-PARDO et al. Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* e de parasitoses intestinais em crianças do Parque Indígena do Xingu. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 5, p. 393-8, 2011.

FERRAND, J.; LEHOURS, P.; SCHMID-ALLIANA, A.; MÉGRAUD, F.; VARON, C. *Helicobacter pylori* Infection of Gastrointestinal Epithelial Cells *in vitro* Induces Mesenchymal Stem Cell Migration through an NF- $\kappa$ B-Dependent Pathway. **Plos ONE**, v. 6, n. 12, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0029007.

GUO, X.; MA, N.; WANG, J.; SONG, J.; BU, X.; CHENG, Y.; SUN, K.; XIONG H.; JIANG, G.; ZHANG, B.; WU, M.; WEI, L. Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapeutic resistance in human gastric cancer cells. **BMC Cancer**, v. 8:375, 2008. doi:10.1186/1471-2407-8-375.fv.

GUO, C.; LIU, S.; WANG, J.; SUN, M.Z.; GREENAWAY, F.T. ACTB in cancer. **Clin Chim Acta**, v. 417, p. 39-44, 2013. doi: 10.1016/j.cca.2012.12.012.

GUR-DEDEOGLU, B.; KONU, O. et al. Identification of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues. **Oncol Res**, n.17, v.8, p.353-65, 2009.

HAHM, K.B.; SONG, Y.J.; OH, T.Y.; LEE, J.S.; SURH, Y.J.; KIM, Y.B.; YOO, B.M.; KIM, J.H.; HAN, S.U.; NAHM, K.T.; KIM, M.W.; KIM, D.Y.; CHO, S.W. Chemoprevention of *Helicobacter pylori*-associated in a Mouse Model; Is It possible?. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 82-94, 2003.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, p. 1–20, 2005.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, n.9, p. 1026-30, 1993.

HOESEL, B.; SCHMID, J.A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v.12, n.86, p. 1-15, 2013.

HOMEY, B.; MULLER, A; ZLOTNIK, A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? **Nature Rev. Immunol**, v. 2, p.175–184, 2002.

HUANG, X.; BIN, L.; ZHANG, S.; DAI, Q.; CHEN, B.; MENG, L. Effects of radix curcumae-derived diterpenoid C on *Helicobacter pylori*-induced inflammation and nuclear factor kappa B signal pathways. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 31, p. 5085-93, 2013. doi:10.3748/wjg.v19.i31.5085.

HUNT R.H. et al. *Helicobacter pylori* in developing countries. **World Gastroenterology Organization Global Guidelines**, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2014: Incidência**

**de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>.

IVANOV, V.N.; RONAI, Z. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. **Oncogene**, v. 19, p. 3003-12, 2000.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, p. 69–90, 2011.

de JONGE, H.J.; FEHRMANN, R.S.; de BONT, E.S. et al. Evidence based selection of housekeeping genes. **PLoS One**, v. 2, n. 9, 2007. doi: 10.1371/journal.pone.0000898.

KIM, S.; SEO, J.H.; KIM, K.H. The effect of p38 mitogen-activated protein kinase on mucin gene expression and apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1010, p. 90-94, 2003. doi: 10.1196/annals.1299.014.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v. 27, p. 95-125, 2006. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

KYRIAKIS, J.M., AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev**, v. 81, n. 2, p. 807-69, 2001.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335-42, 2003.

LEE, J.C.; LAYDON, J.T.; MCDONNELL, P.C.; et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, v. 372, p. 739-46, 1994.

LENASSI, M.; PLEMENITAŠ, A. The role of p38 MAP kinase in cancer cell apoptosis **Radiol Oncol**, v. 40, n. 1, p. 51-6, 2006.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487–501, 2001.

MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori*. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 89, p.116-128, 1994.

MARIENFELD, R. RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. **J Biol Chem**, v. 278, p. 19852-60, 2003.

MAY, M.J.; GHOSH, S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. **Semin Cancer Biol**, v. 8, p. 63-73, 1997.

MEYER-TER-VEHN, T.; COVACCI, A.; KIST, M.; PAHL, H.L. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the protooncogenes c-fos and c-jun. **J Biol Chem**, v. 275, p.16064–72, 2000.

MIAO, X.P.; LI, J.S.; LI, H.Y.; ZENG, S.P.; ZHAO, Y.; ZENG, J.Z. Expression of ornithine decarboxylase in precancerous and cancerous gastric lesions. **World J Gastroenterol**, v. 13, p. 2867-71, 2007.

MISIEWICZ, J.J. Current insights in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 7, p. 701-3, 1995.

MITSUNO, Y. et al. *Helicobacter pylori* induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signalling pathway in gastric cancer cells. **Gut**, v. 49, n. 1, p. 18–22, 2001.

MULLER, L.B.; FAGUNDES, R.B.; MORAES, C.C.; RAMPAZZO, A. Prevalência da infecção por *Helicobacter pylori* e das lesões precursoras do câncer gástrico em pacientes dispépticos. **Arq Gastroenterol**, v. 44, n. 2, p. 93-98, 2007.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 3, p. 323-36, 2002.

NARDONE, G. et al. Expression of COX-2, mPGE-synthase<sub>1</sub>, MDR-1 (P-gp), and Bcl-xl: a molecular pathway of *H pylori*-related gastric carcinogenesis. **J Pathol**, v. 202, p. 305-12, 2004.

NAUMANN, M. et al. Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island. **J Biol Chem**, v. 274, p. 31655–62, 1999.

NEBRED, A. R.; PORRAS, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trends Biochem Sci**, v. 25, p. 257–60, 2000.

O'CALLAGHAN, C.; FANNING, L.J.; BARRY, O.P. p38 $\delta$  MAPK: Emerging Roles of a Neglected Isoform. **Int J Cell Biol**, p. 01-12, 2014. doi: 10.1155/2014/272689.

ORNELLAS, L.C.; CURY, M.; DE LIMA, V.M.; FERRARI JUNIOR, A.P. Evaluation of rapid urease test stored in refrigerator. **Arq Gastroenterol**, v. 37, p. 155-57, 2000.

PARENTE, J.M.L.; PARENTE, M.P.P.D. Contexto epidemiológico atual da infecção por *Helicobacter pylori*. **GED gastroenterol endosc dig**, v. 29, n. 3, p. 86-89, 2010.

PARKIN, D.M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **Int J Cancer**, v. 118, p. 3030-44, 2006.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.

PEEK, J.R.R.M.; CRABTREE, J.E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. **Journal of Pathology**, v. 208, p. 233-48, 2006. doi: 10.1002/path.1868.

PELETEIRO, B. Risk Factors for Gastric Intestinal Metaplasia. **Arquivos de Medicina**, v. 20, n. 4, p. 115-19, 2006.

PEREZ R.; TUPAC-YUPANQUI I. et al. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. *BMC Mol Biol* 9: 79, 2008.

PERRAIS, M.; ROUSSEAUX, C.; DUCOUROUBLE, M.P.; COURCOL, R.; VINCENT, P.; JONCKHEERE, N.; VAN SEUNINGEN, I. *Helicobacter pylori* urease and flagelin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells. **Gastric Cancer**, 2013. doi:10.1007/s10120-013-0267-5.

PIMENTEL-NUNES, P.; GONÇALVES, N.; BOAL-CARVALHO, I.; AFONSO, L.; LOPES, P.; RONCON-ALBUQUERQUE JR, R.; HENRIQUE, R.; MOREIRA-DIAS, L.; LEITE-MOREIRA, A.F.; DINIS-RIBEIRO, M. *Helicobacter pylori* Induces Increased Expression of Toll-Like Receptors and Decreased Toll-Interactin Protein in Gastric Mucosa that Persists Throughout Gastric Carcinogenesis. **Helicobacter**, v. 18, p. 22-32, 2012. doi: 10.1111/hel.12008.

PRESTON-MARTIN, S.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K. et al. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Res**, v. 50, p. 7415–21, 1990.

RISCO, A.; CUENDA, A. New Insights into p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  MAPK Pathways. **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p.1-8, 2012. doi:10.1155/2012/520289.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 365–86, 2000.

RUBIE, C.; KEMPF, K.; HANS, J. et al.: Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. **Mol Cell Probes**, v. 19, p. 101-9, 2005. doi: 10.1016/j.mcp.2004.10.001.

SALIH, B.A.; GUCIN, Z.; BAYYURT, N. A study on the effect of *Helicobacter pylori* infection on p53 expression in gastric cancer and gastritis tissues. **J Infect Dev Ctries**, v. 7, n. 9, p. 651-57, 2013. doi: 10.3855/jidc.2993.

SAMPAIO, A; SANTOS, P. Factores genéticos do *Helicobacter pylori* e do hospedeiro na carcinogênese gástrica. **Rev Port Ciências Biomédicas**, v. 3, n.3, p. 72-78, 2008.

SANTIN, A.P.; SOUZA, A.F.; BRUM, I.S.; FURLANETTO, T.W. Validation of reference genes for normalizing gene expression in real-time quantitative reverse transcription PCR in human thyroid cells in primary culture treated with progesterone and estradiol. **Mol Biotechnol**, v. 54, p. 278-82, 2013. doi: 10.1007/s12033-012-9565-0.

SANTOS, I.S.; BOCCIO, J.; SANTOS, A.S.; VALLE, N.C.J.; HALA, C.S.; BACHILLI, M.C. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and associated factors among adults in Southern Brazil: a population-based cross-sectional study. **BMC Public Health**, 5:118, 2005.

SAURIN, A.T.; MARTIN, J.L.; HEADS, R.J.; FOLEY, C.; MOCKRIDGE, J.W.; WRIGHT, M.J. et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. **FASEB J**, v. 14, p. 2237-46, 2000.

SEO, J.H.; LIM, J.W.; KIM, H. Differential Role of ERK and p38 on NF- $\kappa$ B Activation in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. **J Cancer Prev**, v. 18, p. 346-50, 2013.

SEPULVEDA, A.R. Molecular testing of *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions. **J Clin Gastroenterol**, v. 32, n. 5, p. 377-82, 2001.

SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B.B. Nuclear factor kappaB: a friend or a foe in cancer? **Biochem Pharmacol**, v. 68, n. 6, p.1071–80, 2004.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, p. 9-29, 2014.

SIQUEIRA, J.S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori* – revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2007.

SOUZA, A.F.; BRUM, I.S.; NETO, B.S.; BERGER, M.; BRANCHINI, G. Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. **Mol Biol Rep**, v. 40, p. 2955-62, 2013. doi: 10.1007/s11033-012-2366-5.

SUGANUMA, M.; KURUSU, M.; OKABE, S.; SUEOKA, N.; YOSHIDA, M.; WAKATSUKI, Y; FUJIKI, H. *Helicobacter pylori* membrane protein 1: A new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. **Cancer Res**, v. 61, p. 6356-59, 2001.

SUGANUMA, M.; KURUSU, M.; SUZUKI, K.; NISHIZONO, A.; MURAKAMI, K.; FUJIOKA, T.; FUJIKI, H. New tumor necrosis factor- $\alpha$ -inducing protein released from *Helicobacter pylori* for gastric cancer progression. **J Cancer Res Clin Oncol**. v. 131, 305-13, 2005.

SUGANUMA, M.; TAKASHI, K.; YAMAGUCHI, K.; FUJIKI, H. Carcinogenic Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inducing Protein of *Helicobacter pylori* in Human Stomach. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.

SUZUKI, H.; HIBI, T.; MARSHALL, B.J. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. **J Gastroenterol**, v. 42, p. 1–15, 2007.

TESTERMAN, T.L.; MORRIS, J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 36, p.12781-808, 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12781.

VALLADARES, A.; ALVAREZ, A.M.; VENTURA, J.J.; RONCERO, C.; BENITO, M.; PORRAS, A. p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes. **Endocrinology**, v. 141, p. 4383-95, 2000.

WABINGA, H.R. Comparison of immunohistochemical and modified Giemsa stains for demonstration of *Helicobacter pylori* infection in an African population. **Afr Health Sci**, v. 2, p. 52-55, 2002.

WAGNER, E.F.; NEBRED, A.R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviews**, v.9, p. 537-49, 2009. doi:10.1038/nrc2694.

WANG, X.S.; DIENER, K.; MANTHEY, C. L. et al., Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 38, p. 23668–74, 1997.

WILSON, K.P.; FITZGIBBON, M.J.; CARON, P.R.; GRIFFITH, J.P.; CHEN, W.; MCCAFFREY, P.G. et al. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 271, p. 27696-700, 1996.

WISNIESKI, F.; CALCAGNO, D.Q.; LEAL, M.F. et al.: Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. **World J Gastroenterol**, v. 19, p. 7121-28, 2013. doi: 10.3748/wjg.v19.i41.7121.

YAMAOKA Y, et al. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. **Gastroenterology**, v. 123, p. 414-24, 2002.

YAMAOKA, Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v.7, n.11, p. 629-641, 2010. doi:10.1038/nrgastro.2010.154.

YAMAOKA Y, et al. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 2274-79, 1999.

YONG, H.Y.; KO, M.S.; MOON, A. The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 18, n. 12, p. 1893-905, 2009. doi: 10.1517/13543780903321490.

ZECHNER, D.; CRAIG, R.; HANFORD, D.S.; MCDONOUGH, P.M.; SABBADINI, R.A.; GLEMBOTSKI, C.C. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen- activated protein kinase-dependent manner. **J Biol Chem**, v. 273, p. 8232-9, 1998.

ZHAO, C.; LU, X.; BU, X.; ZHANG, N.; WANG, W. Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the upregulation of CXCR4 expression in gastric cancer induced by *Helicobacter pylori*. **BMC Cancer**, v.10, 2010. doi:10.1186/1471-2407-10-419.

ZUK, K.; PECZEK, L.; STEC-MICHALSKA, K.; MEDREK, M.; NAWROT, B. SATB1 expression in gastric mucosa in relation to *Helicobacter pylori* infection and family history of gastric cancer. **Adv Med Sci**. v. 57, n. 2, p. 237-43, 2012.



## APÊNDICES

## Apêndice A

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Esta pesquisa, intitulada **Avaliação da expressão de genes relacionados a alterações precursoras de neoplasias da mucosa gástrica**, está sendo desenvolvida pelo aluno do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Biotecnologia do Centro Universitário UNIVATES, Henrique Sulzbach de Oliveira, orientado pela profa. Dra. Adriane Pozzobon, com o objetivo de investigar a genética de processos inflamatórios no tecido estomacal, relacionando à contaminação pela *Helicobacter pylori*, bactéria muito comum encontrada no estômago. A importância desta investigação reside no fato de termos ampla prevalência na quantidade de queixas relacionadas ao sistema gastrointestinal (estômago e intestino), e torna-se necessário conhecer a resposta do organismo frente à contaminação bacteriana e os diferentes tipos de lesões no estômago nas diversas populações, visando buscar melhores soluções e tratamento para este tipo de doença.

Para tanto será necessário que, durante o seu exame de endoscopia digestiva alta, se houver necessidade da realização de biópsia, um dos fragmentos seja direcionado para a presente pesquisa. De posse deste fragmento, poderemos realizar a avaliação da expressão de genes (componentes do seu código genético) relacionados à inflamação do estômago.

A endoscopia digestiva alta é, conforme a Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (2013), um exame seguro, com complicações sendo muito raras (menos de 0,2% dos casos). Dentre os riscos pode ocorrer sangramento, este é mínimo e raramente há necessidade de internação, transfusão sanguínea ou cirurgia. Complicações maiores como perfuração são raras, mas podem acontecer mesmo que o procedimento tenha sido realizado sob o mais rigoroso padrão técnico. Além disso, para a realização do procedimento será necessário o emprego de sedação, que será administrada pelo próprio médico endoscopista. Esta medicação ministrada na ocasião do exame causa sonolência, amnésia recente de curta duração e relaxamento muscular. Eventos adversos tais como alergia da pele e/ou mucosa podem ocorrer caso você possua alergia a um dos componentes do medicamento utilizado.

O direcionamento de um dos fragmentos para a presente pesquisa não afetará o seu diagnóstico nem afetará a realização do exame pelo seu médico, visto que serão retirados

dois fragmentos na mesma localidade, sendo um deles direcionado ao laboratório para o exame de rotina. A biópsia é indolor, e sua realização ou não durante o exame cabe exclusivamente ao médico assistente, sendo em nenhum momento realizada sem indicação clínica para tal. Não haverá armazenamento do seu material biológico, pois a quantidade obtida é muito pequena e servirá apenas para este estudo. Será necessário acesso ao seu prontuário médico para coleta dos seguintes dados, que serão fornecidos pelo médico assistente: data de nascimento, sexo, indicação clínica do exame, histórico médico, laudos de diagnóstico da endoscopia e exame anatomopatológico. Os dados obtidos a partir deste estudo serão armazenados em formulário pelo pesquisador sob sigilo, por um período de 05 anos, em local reservado de acesso somente a equipe de pesquisa e, após, serão descartados. Os resultados serão utilizados apenas para fins científicos e poderão ser publicados em forma de artigos, monografia, congressos e simpósios, sempre mantendo o sigilo dos participantes. O pesquisador garante o acesso do participante aos resultados da análise da expressão gênica, cujo relatório será disponibilizado para retirada junto a seu médico.

O maior benefício desta pesquisa será as informações que serão obtidas, podendo ser utilizadas pela comunidade científica para a compreensão dos diversos tipos de doença gástrica bem como sua relação com a contaminação pela *H. pylori*. De forma indireta, você estará se beneficiando no intuito de que a compreensão a respeito dos mecanismos envolvidos na inflamação do estômago pode colaborar para o desenvolvimento de novos tipos de tratamentos e medicamentos.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido declaro que autorizo a minha participação nesta pesquisa, pois fui devidamente informado, de uma forma clara e detalhada, livre de qualquer constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos instrumentos de coleta de informações que serão utilizadas, dos riscos e benefícios, conforme já citados neste termo.

Fui igualmente informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;

- Da garantia de retirar meu consentimento e, a qualquer momento, deixar de participar do estudo;

- Da garantia de que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados à pesquisa;

- De que, se existirem gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa e não terei nenhum tipo de gasto previsto.

Este termo será assinado em duas vias, sendo que uma delas será retida pelo sujeito da pesquisa e a outra será arquivada pelo pesquisador.

O responsável por esta pesquisa é Henrique Sulzbach de Oliveira (Fone: 51 9118-7361), tendo este documento sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVATES através do parecer CEP 353.624 de 01/08/2013.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

RG ou CPF:

Henrique Sulzbach de Oliveira

Pesquisador. RG: 3061027301

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

## Apêndice B

### Dados do paciente

Nome \_\_\_\_\_

Sexo                      Masculino(    )                      Feminino(    )

Idade: \_\_\_\_\_

Tabagista                      Sim(    )                      Não(    )

Uso de álcool diário   Sim(    )                      Não(    )

História Familiar de

Cancer gástrico           Sim(    )                      Não(    )

Tratamento prévio

para Helicobacter       Sim(    )                      Não(    )

---

### Achados Endoscópicos (preenchido pelo médico)

Normal                      Sim(    )                      Não(    )

Pangastrite                      Sim(    )                      Não(    )

Gastrite Enantematosa

Antral                      Sim(    )                      Não(    )

Gastrite Enantematosa

Corpo                      Sim(    )                      Não(    )

Atrofia da mucosa       Sim(    )                      Não(    )

Úlcera gástrica           Sim(    )                      Não(    )

Úlcera duodenal        Sim(    )                      Não(    )

Número de Biópsias   Antro(    )                      Corpo(    )

## **ANEXOS**

## Anexo A

### Representação das reações de qPCR em tempo real

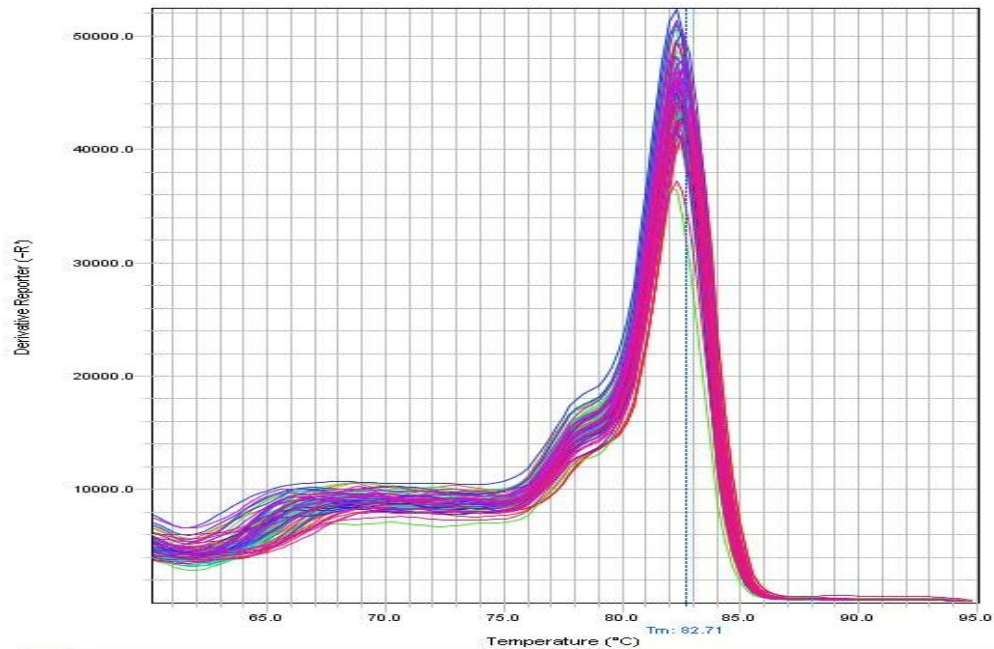


Figura 17 - Curva de *melting* para o gene NFKB1. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 82.71°C corresponde ao produto de 209 pb do gene do NFKB1.

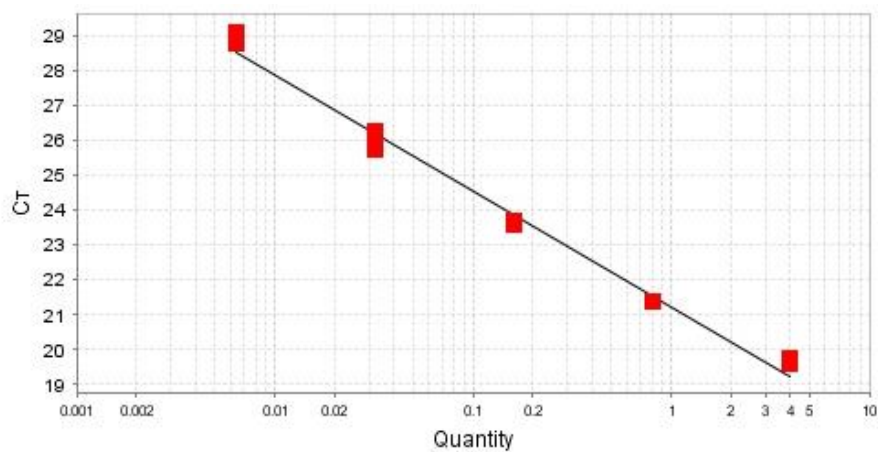


Figura 18 - Curva padrão para o gene NFKB1. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAC de tecido gástrico. De 4 a 0,0064 ng de DNAC.  $R^2 = 0.99$ , Eff%: 100.022.

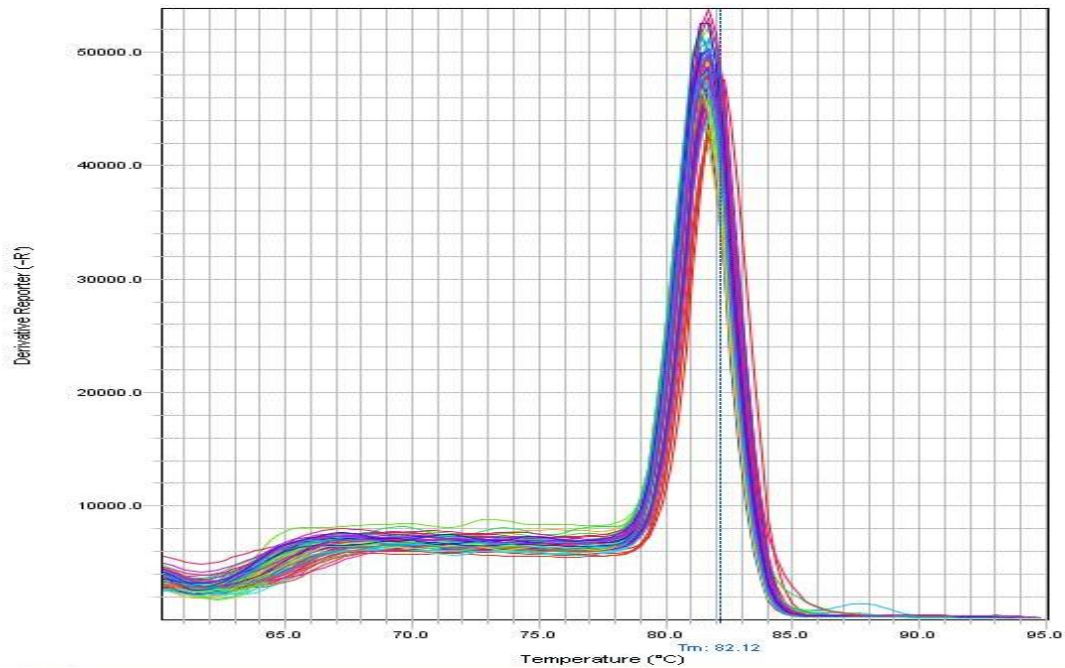


Figura 19 - Curva de *melting* para o gene p38 $\alpha$  (MAPK14). A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 82.12°C corresponde ao produto de 243 pb do gene p38 $\alpha$  (MAPK14).

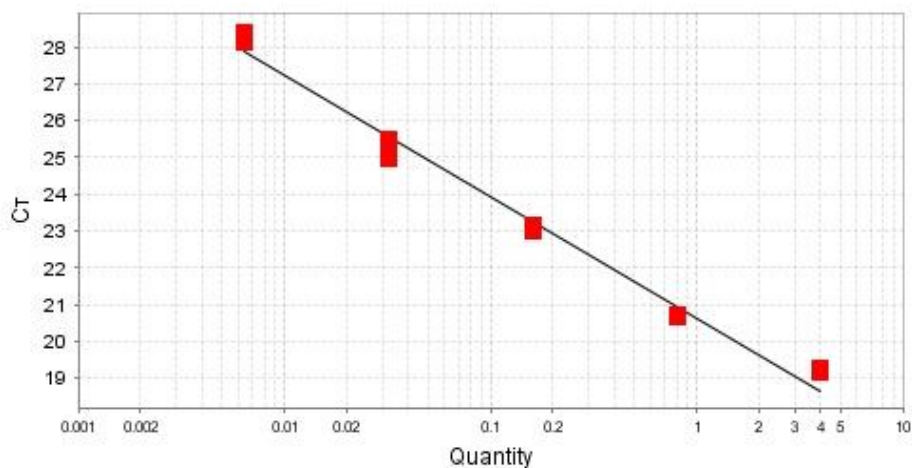


Figura 20 - Curva padrão para o gene p38 $\alpha$  (MAPK14). A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido gástrico. De 4 a 0,0064 ng de DNAc.  $R^2 = 0.987$ , Eff%: 100.996.



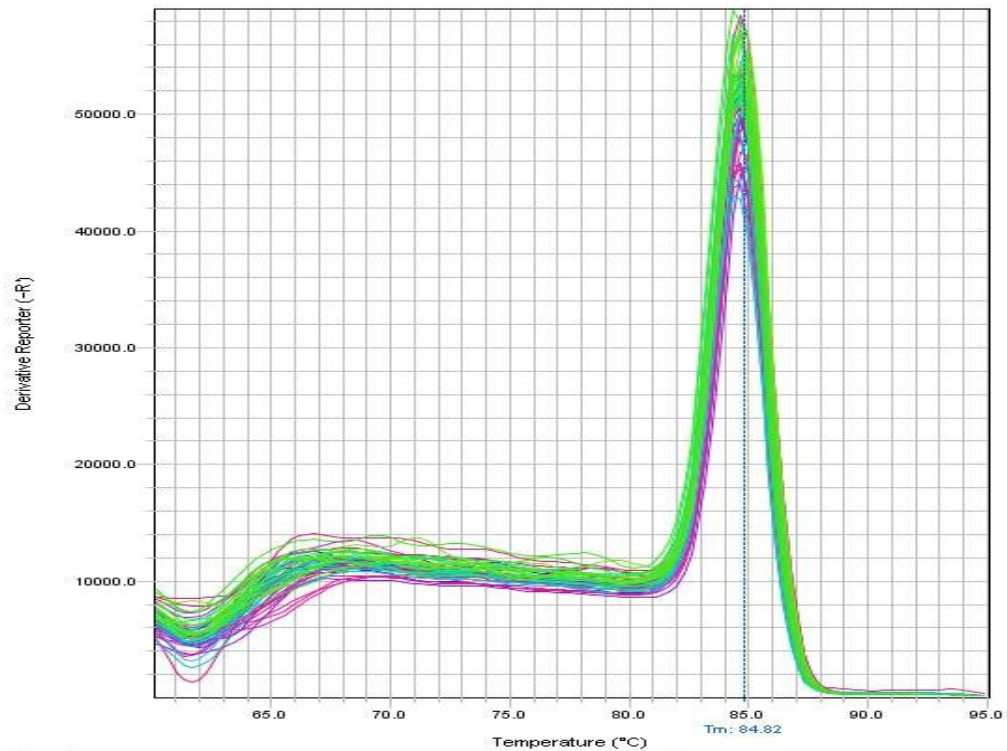


Figura 21 - Curva de *melting* para o gene TNF- $\alpha$ . A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 84.82°C corresponde ao produto de 120 pb do gene do TNF- $\alpha$ .

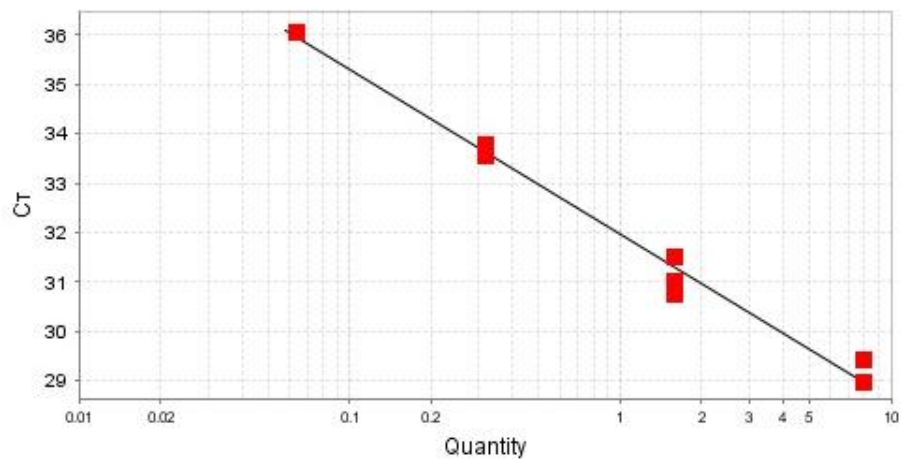


Figura 22 - Curva padrão para o gene TNF- $\alpha$ . A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido gástrico. De 8 a 0,064 ng de DNAc.  $R^2 = 0.988$ , Eff%: 99.557.

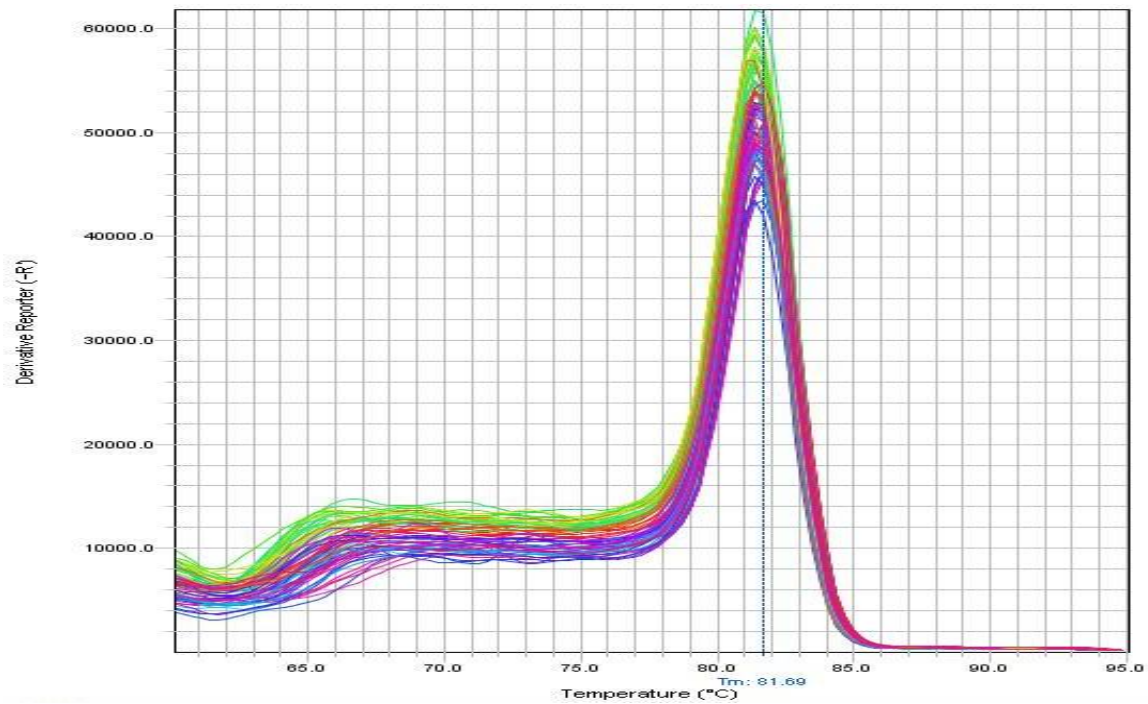


Figura 23 - Curva de *melting* para o gene SDHA. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 81.69°C corresponde ao produto de 85 pb do gene do SDHA.

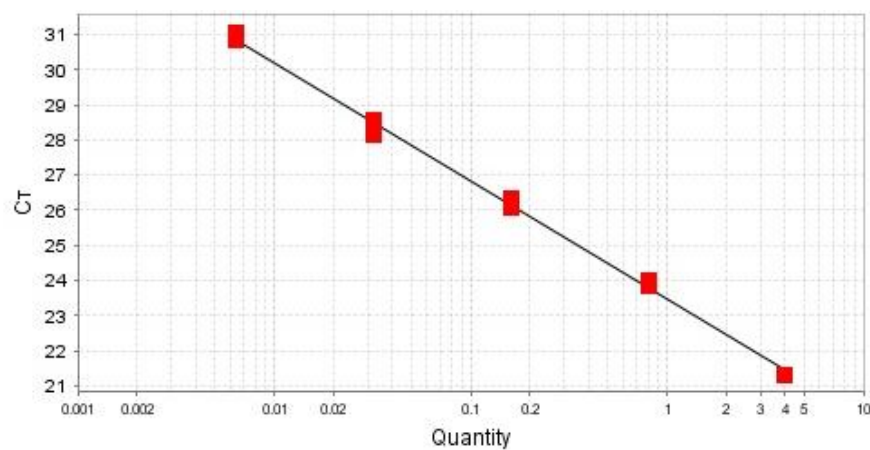


Figura 24 - Curva padrão para o gene SDHA. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido gástrico. De 4 a 0,0064 ng de DNAc.  $R^2 = 0.997$ , Eff%: 98.825.

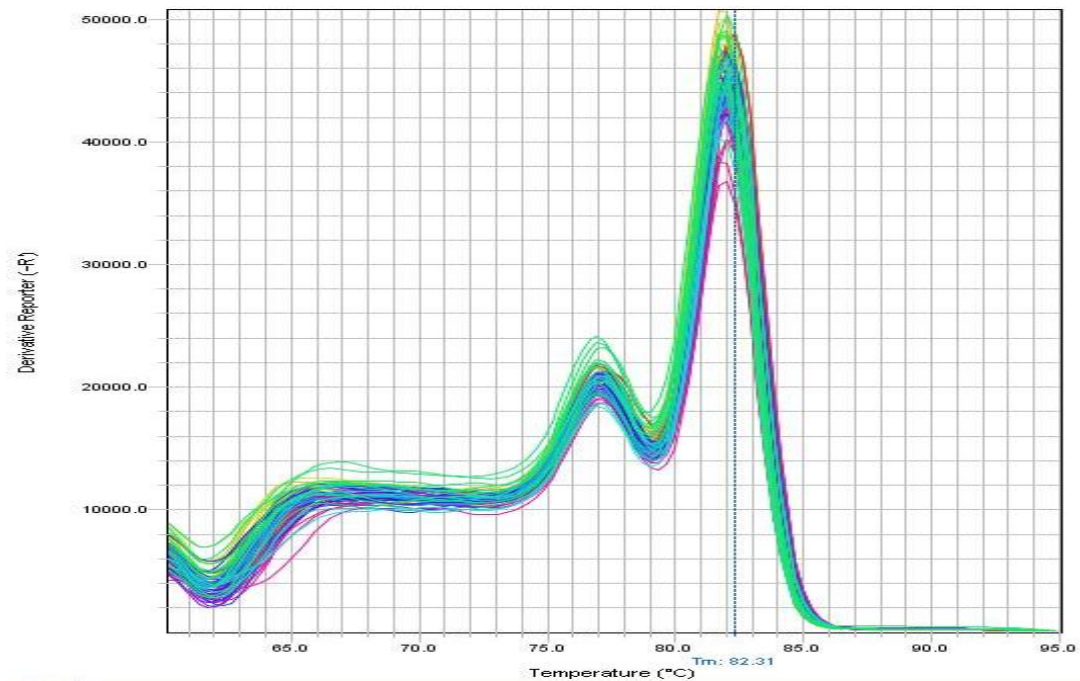


Figura 25 - Curva de *melting* para o gene ACTB. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 82.31 °C corresponde ao produto de 140 pb do gene ACTB.

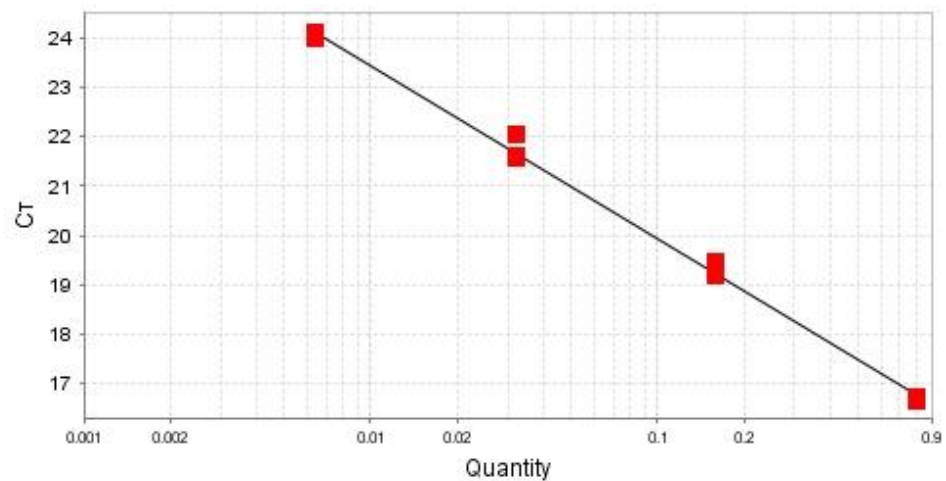


Figura 26 - Curva padrão para o gene ACTB. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido gástrico. De 0,8 a 0,0064 ng de DNAc.  $R^2 = 0.997$ , Eff%: 92.546.

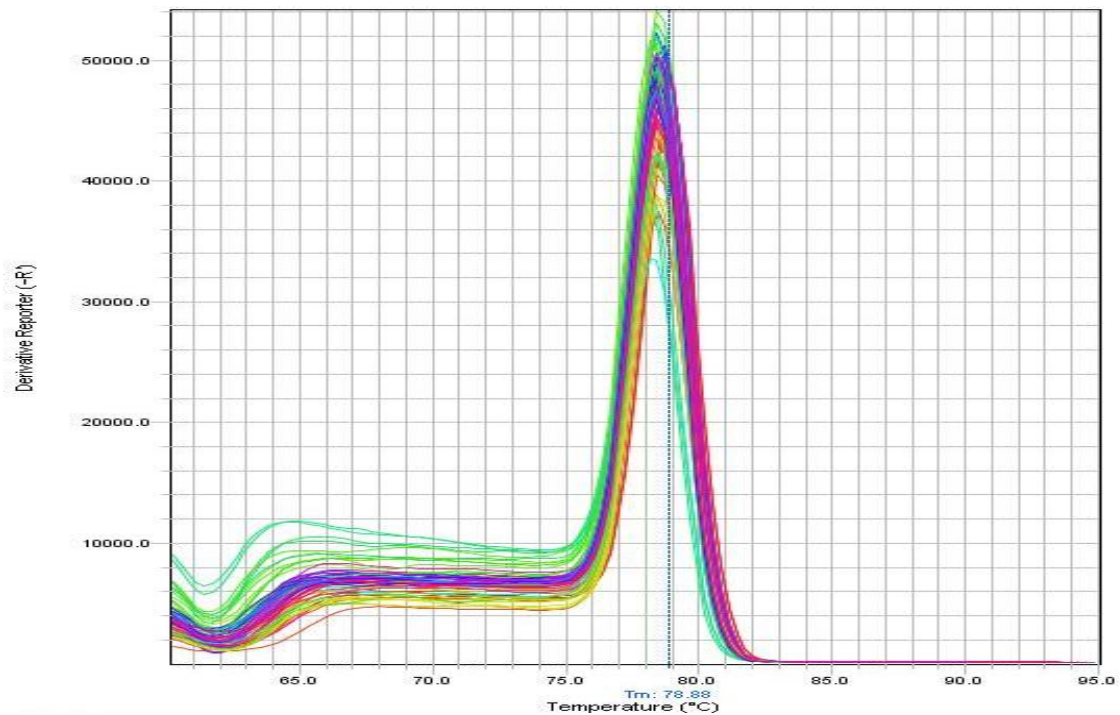


Figura 27 - Curva de *melting* para o gene B2M. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 78.88 °C corresponde ao produto de 165 pb do gene do B2M.

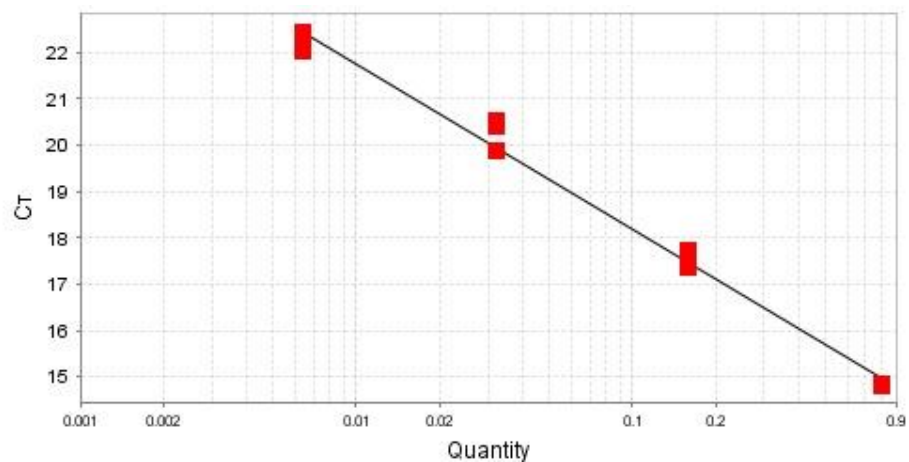


Figura 28: Curva padrão para o gene B2M. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAc de tecido gástrico. De 0,8 a 0,0064 ng de DNAc.  $R^2 = 0.991$ , Eff%: 90.461.

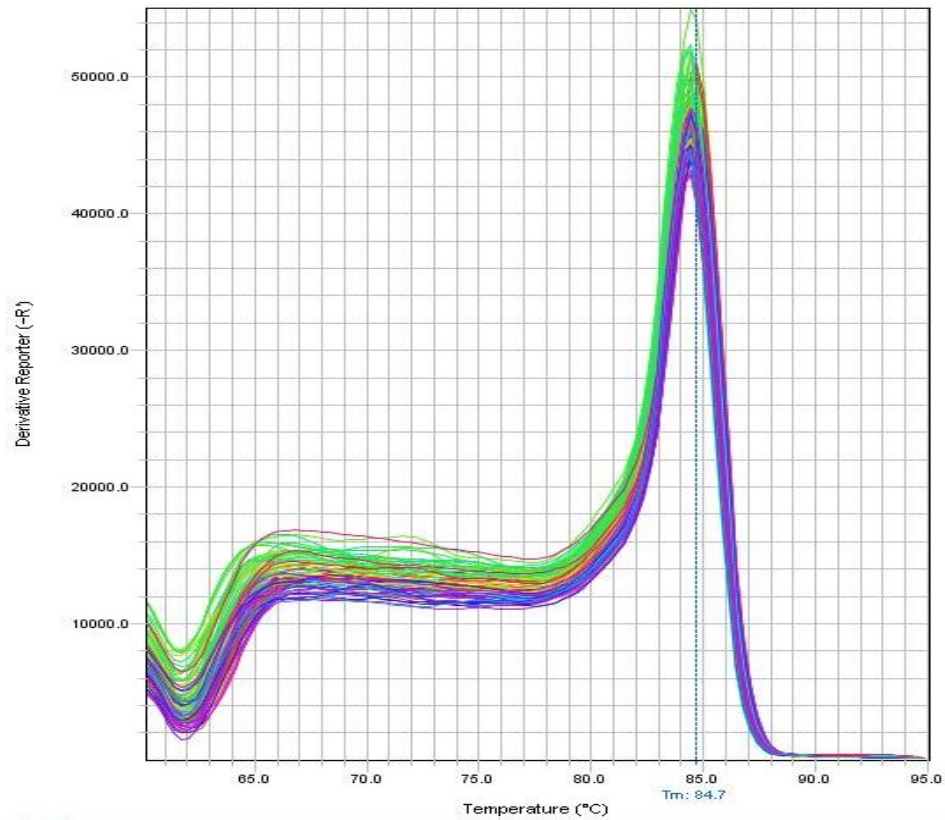


Figura 29 - Curva de *melting* para o gene GAPDH. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 84.7 °C corresponde ao produto de 133 pb do gene GAPDH.

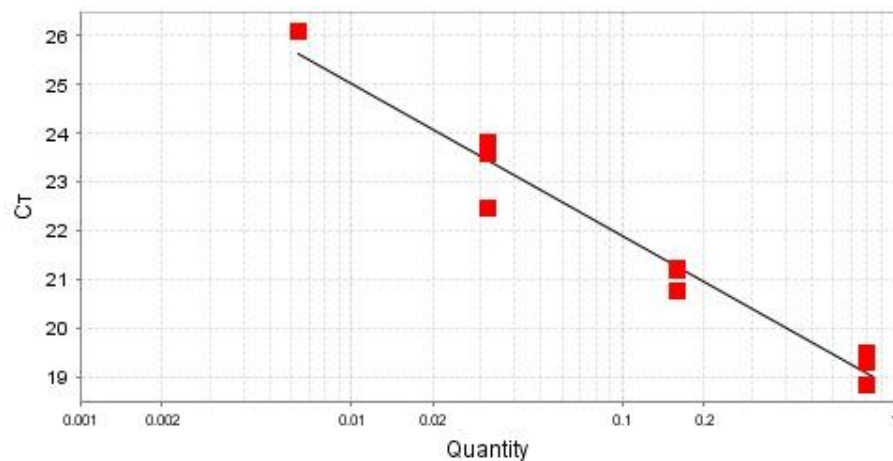


Figura 30 - Curva padrão para o gene GAPDH. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAC de tecido gástrico. De 0,8 a 0,0064 ng de DNAC.  $R^2 = 0.961$ , Eff%: 108.381.



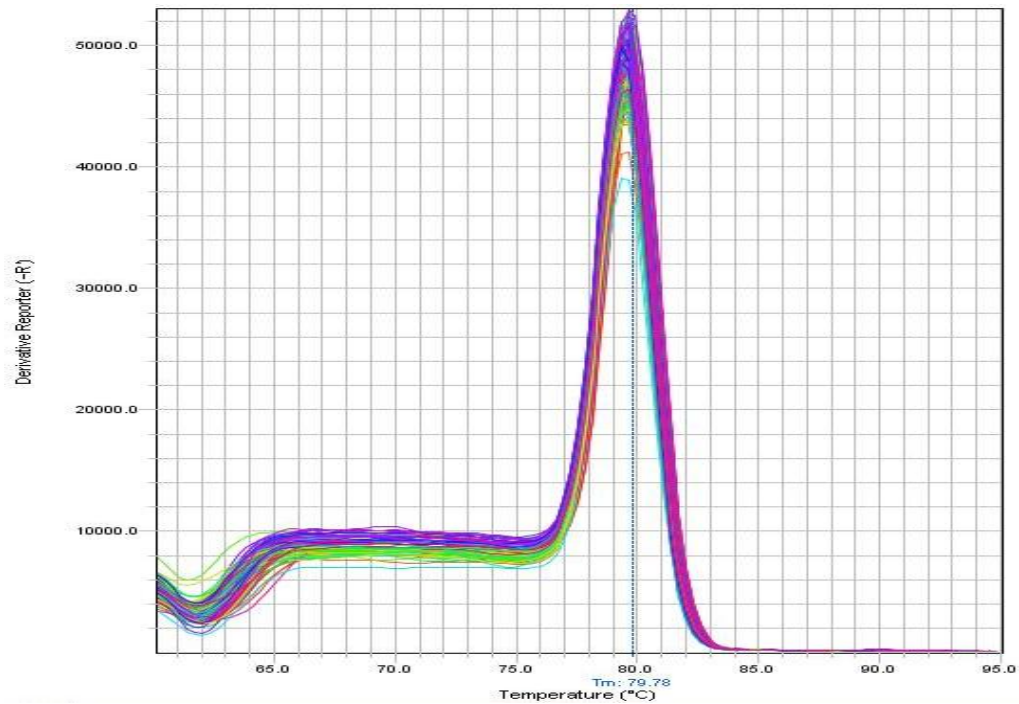


Figura 31 - Curva de *melting* para o gene HPRT1. A curva foi construída com aumentos gradativos de 0,2 °C, entre 55 e 94 °C, com a fluorescência sendo lida nestes intervalos. O pico indicado na Tm de 79.78 °C corresponde ao produto de 128 pb do gene HPRT1.

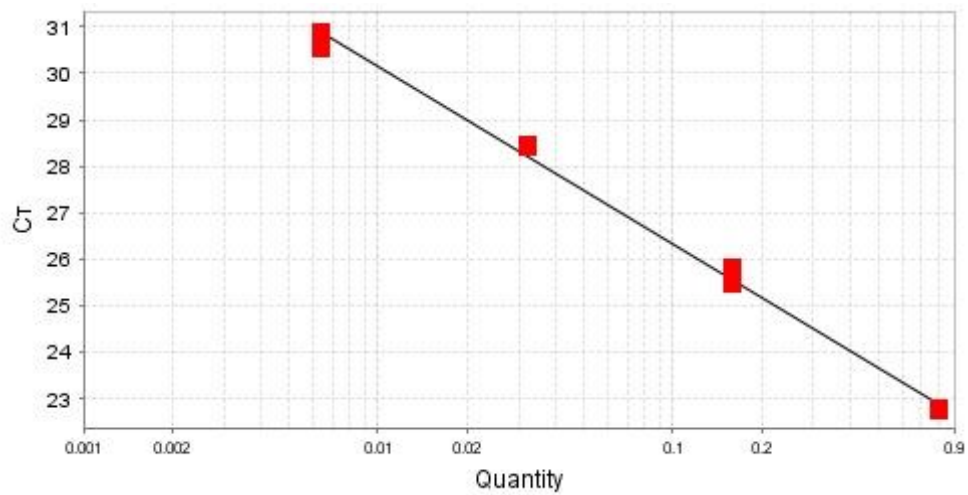


Figura 32 - Curva padrão para o gene HPRT1. A curva foi construída com quantidades conhecidas de DNAC de tecido gástrico. De 0,8 a 0,0064 ng de DNAC.  $R^2 = 0.997$ , Eff%: 82.975.